

Aus dem Institut und der Poliklinik für Arbeits-, Sozial-  
und Umweltmedizin

Institut der Ludwig-Maximilians-Universität München

Vorstand: Prof. Dr. med. Dennis Nowak

# **Marker der biologischen Alterung bei Patienten mit chronisch-obstruktiver Lungenerkrankung (COPD)**

Dissertation

zum Erwerb des Doktorgrades der Medizin

an der Medizinischen Fakultät der

Ludwig-Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von

Veronika Graf

aus Meran

2020

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät der Universität München

Berichterstatter: PD Dr. rer. nat. Dipl.-Biol Rudolf A. Jörres

Mitberichterstatter: Prof. Dr. med. Silke Meiners  
Prof. Dr. med. Andreas Wollenberg

Mitbetreuung durch die  
promovierten Mitarbeiter: PD Dr. med. Kathrin Kahnert,  
Dr. med. Stefan Karrasch

Dekan: Prof. Dr. med. dent. Reinhard Hickel

Tag der mündlichen Prüfung: 26.11.2020

## **Eidesstattliche Versicherung**

Ich erkläre hiermit an Eides statt,

dass ich die vorliegende Dissertation mit dem Thema

### **Marker der biologischen Alterung bei Patienten mit chronisch-obstruktiver Lungenerkrankung (COPD)**

selbständig verfasst, mich außer der angegebenen keiner weiteren Hilfsmittel bedient und alle Erkenntnisse, die aus dem Schrifttum ganz oder annähernd übernommen sind, als solche kenntlich gemacht und nach ihrer Herkunft unter Bezeichnung der Fundstelle einzeln nachgewiesen habe.

Ich erkläre des Weiteren, dass die hier vorgelegte Dissertation nicht in gleicher oder in ähnlicher Form bei einer anderen Stelle zur Erlangung eines akademischen Grades eingereicht wurde.

München, den 20.01.2020

Veronika Graf

# Inhaltsverzeichnis

<b>1 Einleitung</b>	6
1.1 COPD	6
1.2 COPD und Komorbiditäten	8
1.3 Alterung, Alterungsmarker, Hautalterung	10
1.3.1 Alterung	10
1.3.2 Marker im Blut	14
1.3.3 COPD und Hautalterung	17
1.4 Replika (Abdrücke) der Hautoberfläche sowie Fotos	19
1.5 COSYCONET (German COPD and Systemic Consequences - Comorbidities Network)	20
<b>2 Fragestellung</b>	22
<b>3 Material und Methoden</b>	23
3.1 Beschreibung von COSYCONET	23
3.1.1 Einschlusskriterien	23
3.1.2 Ausschlusskriterien	24
3.1.3 Befragung und Vitalparameter	24
3.1.4 Untersuchungen	25
3.2 Patientenkollektiv	28
3.3 Herstellung von Hautreplika und deren Auswertung	29
3.4 Fotografische Aufnahmen der Haut und deren Auswertung	31
3.5 Alterungsmarker im Blut	32
3.5.1 Probennahme und RNA-Isolierung	32
3.5.2 Transkription	32
3.5.3 Real-Time-PCR	33
3.5.4 Aufbereitung und Ergebnisberechnung der gemessenen Rohdaten	35
3.6 Berechnungen von Parametern	36
3.7 Datenauswertung	37
<b>4. Ergebnisse</b>	38
4.1 Basischarakteristika der Kohorte	38
4.1.1 Anthropometrische Daten	38
4.1.2 Lungenfunktionsdaten und Emphysemscore	40

4.2 Phänotypische Hautalterung.....	41
4.2.1 Beschreibung der Hautanalyse.....	41
4.2.2 Zusammenhang mit der Lungenfunktion .....	50
4.2.3 Zusammenhang mit anderen klinischen und funktionellen Größen .....	59
4.2.4 Zusammenhang mit vaskulärer Funktion und Entzündungsparametern.....	66
4.3 Molekulare Marker von Alterung und Regeneration .....	67
4.3.1 Beziehungen zwischen der Expression verschiedener Gene .....	67
4.3.2 Zusammenhang mit Lungenfunktion und Emphysemscore .....	72
4.3.3 Zusammenhang mit den Blutgasen .....	73
4.3.4 Zusammenhang mit den Parametern der Hautabdrücke .....	75
4.3.5 Zusammenhang mit anthropometrischen Messgrößen und Komorbiditäten.....	76
4.3.6 Zusammenhang mit vaskulären Funktionen und Entzündungsparametern .....	79
4.4 Fotoauswertung.....	81
4.4.1 Zusammenhang mit den Hautabdrücken.....	81
4.4.2 Zusammenhang mit der Lungenfunktion .....	83
4.4.3 Zusammenhang mit den Blutgasen .....	84
4.4.4 Zusammenhang mit der Genexpression.....	84
<b>5 Diskussion .....</b>	<b>85</b>
5.1 Charakteristika der Patienten .....	85
5.2 Methodologische Aspekte der Hautalterung .....	85
5.3 Hautalterung und Lungenfunktion.....	88
5.4 Faktoren der biologischen Alterung .....	90
5.5 Genexpressionen potentieller Alterungsmarker .....	91
5.6 Limitationen der Arbeit.....	95
5.7 Schlussfolgerungen der Arbeit.....	96
5.8 Ausblick .....	97
<b>6 Zusammenfassung .....</b>	<b>98</b>
<b>7 Anhang .....</b>	<b>102</b>
7.1 Auszug aus Handbuch GFMesstechnik.....	102
7.2 Produktanwendung RNA-Isolierung, Promega .....	105
7.3 Abbildungsverzeichnis .....	107
7.4 Tabellenverzeichnis .....	109
7.5 Literaturverzeichnis .....	110
<b>8 Danksagung .....</b>	<b>117</b>

# Abkürzungsverzeichnis

Abb.: Abbildung
ABI: Knöchel-Arm-Index
AGE: Advanced Glycation End Products
ATM: Ataxia teleangiectatica
BE: Base-Excess
BMI: Body-Mass-index
CaO <sub>2</sub> : Concentration of arterial oxygen concentration
CAT: Catalase
CAT-Score: COPD Assessment Test
CDK: zyklinabhängige Kinaswn (Cyclin-dependent Kinases)
CDKN1A: Cyclin dependent kinase inhibitor 1A; =p21
cDNA: komplementäre DNA
CO: Kohlenmonoxid
COPD: Chronisch-obstruktive Lungenerkrankung (Chronic Obstructive Pulmonary Disease)
COSYCONET: German COPD and Systemic Consequences - Comorbidities Network
CRP: C-reaktives Protein
Ct (=Cq) =Cycle Threshold; Schwellenwert, bei der das Signal der PCR sich erstmalig deutlich vom Hintergrund abhebt
dl: Deziliter
DNA: Desoxyribonukleinsäure (Desoxyribonucleic acid)
DALY: disability-adjusted life years
CT: Computertomographie
EDTA: Ethylendiamintetraessigsäure (Ethylenediaminetetraacetic acid)
EKG: Elektrokardiogramm
ERV: Exspiratorisches Reservevolumen
FEV <sub>1</sub> : Forciertes Einsekundenvolumen (Forced Expiratory Volume in the first second)
FRC: Funktionelle Residualkapazität (functional residual capacity)
FOXO3: Forkhead box O-3
FVC: Forcierte Vitalkapazität (Forced Vital Capacity)
gDNA: genomische DNA
GLI: Global Lung Function Initiative
GOLD: Global Initiative for Chronic Obstructive Lung Disease
Hb: Hämoglobin
HbA1c: Glykohämoglobin

HDL: High Density Lipoprotein
HPRT1: Hypoxanthine Phosphoribosyltransferase 1
IC: Inspiratorische Kapazität
IGF: Insulin-like Growth Factor
ITGV: Intrathorakales Gasvolumen
IVC: Inspiratorische Vitalkapazität
Kap.: Kapitel
KCO: Transferkoeffizient für Kohlenmonoxid
kg: Kilogramm
KL: Klothe
Ku70: bei der DNA-Reparatur beteiligtes Protein
LDL: Low Density Lipoprotein
LMNA: Lamin A
LMU: Ludwig-Maximilians-Universität
m: Meter
MAX: Maximum
MIN: Minimum
mg: Milligramm
mm: Millimeter
mm <sup>2</sup> : Quadratmillimeter
MMP: Matrix-Metallo-Proteinase
mMRC: modified Medical Research Council
mtDNA: mitochondriale DNA
MW: Mittelwert
µm: Mikrometer
n: Fallzahl
NF-κB: Nukleärer Faktor Kappa B
NL: Nasolabiale Falten
p: Signifikanzwert
PaO <sub>2</sub> : arterieller Sauerstoffpartialdruck
PaCO <sub>2</sub> : arterieller Partialdruck von Kohlendioxid
PCR: Polymerase-Kettenreaktion
PO: Periorbitale Falten
PPIA: Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase A
p16: CDK-Inhibitor Protein 16
p21: CDK-Inhibitor Protein 21
p53: Tumorsuppressor
qPCR: Quantitative real-time PCR

R: Korrelationskoeffizient
R <sup>2</sup> : Bestimmtheitsmaß
RNA: Ribonukleinsäure (Ribonucleic acid)
RPLP0: Ribosomal protein lateral stalk subunit P0
SaO <sub>2</sub> : Sauerstoffsättigung
SD: Standardabweichung
SDHA: Succinate dehydrogenase complex, subunit A, flavoprotein variant
SIRT: Sirtuin
SIRT1: Sirtuin 1
SOD2: Superoxide Dismutase 2
SOP: Standard Operating Procedure
sR <sub>tot</sub> : totaler spezifischer Atemwegswiderstand
sR <sub>eff</sub> : effektiver spezifischer Atemwegswiderstand
STAT3: Signal Transducer and Activator of Transcription 3
Std.: Standard
Tab.: Tabelle
TLC: Totale Lungenkapazität
TLCO: Diffusionskapazität
UV: Ultraviolett
VEGF: vascular endothelial growth factor
WRN: Werner Protein
XRCC5: X-ray repair cross complementing 5
XRCC6: X-ray repair cross complementing 6
YWHAZ: Tyrosine 3-Monooxygenase



# 1 Einleitung

## 1.1 COPD

Die chronisch-obstruktive Lungenerkrankung (COPD) ist eine verbreitete Erkrankung der Atemwege und Lunge, die mit erheblichen extrapulmonalen Komorbiditäten einhergehen kann, welche zur Schwere der Erkrankung und Prognose beitragen. Pulmonal kommt es vor allem zu einer nicht vollständig reversiblen Einschränkung des Atemstroms, häufig mit progredientem Verlauf. Diese Limitation wird mit einer Entzündungsreaktion der Lunge auf schädigende Partikel und Gase (vor allem Zigarettenrauch) in Verbindung gebracht, die mit einer obstruktiven Bronchiolitis der kleinen Atemwege und einer Zerstörung des Parenchyms (Emphysem) einhergeht [Rabe et al., 2007]. Die COPD ist gemäß einer Vielzahl von Studien die vierthäufigste Todesursache [Lopez et al., 2006], und es wurde prognostiziert, dass sie im Jahr 2020 sogar auf Platz 3 vorrücken wird [Vestbo et al., 2013]. Des Weiteren zählt die COPD laut der Global Burden of Disease-Studie auch zu den führenden Ursachen von DALYs (disability-adjusted life years), welche neben den verlorenen Lebensjahren auch jene mit Behinderung und Alter berücksichtigen, also einer Beeinträchtigung im Alltagsleben [Murray & Lopez, 1997].

Die Hauptsymptome der Erkrankung umfassen eine chronische und progressive Dyspnoe, die Produktion von Sputum, Husten und eine Einschränkung des Atemstroms durch Obstruktion [Rabe et al., 2007]. Letztere kann mittels Spirometrie gemessen und u.a. durch die Bestimmung des Tiffeneau-Index, d.h. des Quotienten aus  $FEV_1$  (Einsekundenkapazität) und FVC (forcierte Vitalkapazität), objektiviert werden sowie durch den Wert von  $FEV_1$  in Prozent vom Soll-Wert, mittels dessen der Schweregrad der Erkrankung bestimmt wird [Vestbo et al., 2013]. Somit stellt die Spirometrie das nach wie vor wichtigste und am weitesten verfügbare funktionelle Diagnosemittel dar. Gemäß GOLD (Global Initiative for Chronic Obstructive Lung Disease [www.goldcopd.com, 2019]) sollte ein post-bronchodilatatorischer Quotient  $FEV_1/FVC$  kleiner 0,7 vorliegen und als Diagnosekriterium dienen [Rabe et al., 2007], doch gibt es auch weitere Definitionen [z.B. Criée et al., 2015].

Für die Einteilung in Schweregrade (GOLD-Grade 1-4; [www.goldcopd.com, 2019]) wird üblicherweise die Spirometrie mit der Bestimmung der Einsekundenkapazität

FEV<sub>1</sub> herangezogen. Bei Patienten im GOLD-Stadium 1, d.h. mit einer leichtgradigen Ausprägung der COPD, beträgt die forcierte Einsekundenkapazität FEV<sub>1</sub> über 80% des Sollwertes. Im Stadium 2, einem moderaten Krankheitsstadium, liegt der Wert von FEV<sub>1</sub> im Bereich von 50% - 80% des Sollwertes. Im schweren Stadium 3 ist FEV<sub>1</sub> auf Werte zwischen 30% - 50% des Sollwertes reduziert. Alle Patienten mit Werten unter 30% des Sollwertes werden dem sehr schweren Stadium 4 zugezählt [Rabe et al., 2007].

In einer zweiten Klassifikation [Vogelmeier et al., 2017] werden die Symptome und die Häufigkeit und Schwere der Exazerbationen, d.h. akuter Verschlechterungen der Erkrankung, berücksichtigt. Dies dient vor allem der Risikoeinschätzung für künftige Exazerbationen. Auf Basis der Symptome und des Exazerbationsrisikos können die Patienten entsprechend in die vier GOLD-Gruppen A, B, C und D eingeteilt werden [Vogelmeier et al., 2017], die auch für die Zuordnung der empfohlenen Therapie von Bedeutung sind. Die Einteilung der Symptome, die bei der Klassifikation in GOLD-Gruppen verwendet wird, beruht auf dem CAT-Score (COPD Assessment Test) oder dem mMRC (modified Medical Research Council).

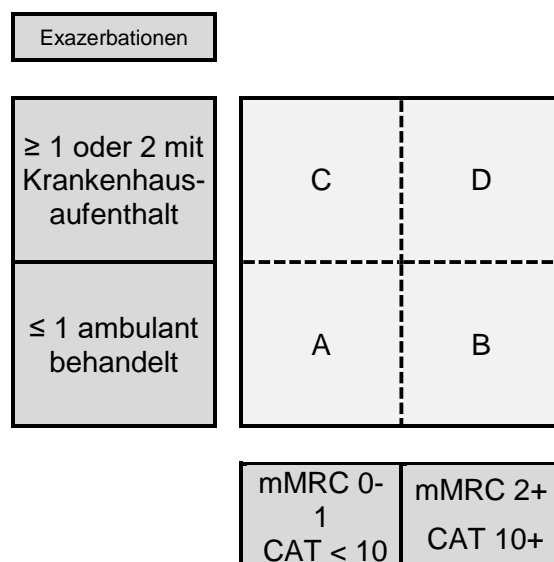


Abb. 1.1: Schweregradeinteilung der COPD in die ABCD-Klassifikation modifiziert nach der Darstellung der Atemwegsliga (<https://www.atemwegsliga.de/copd.html>). CAT bedeutet den numerischen Wert des CAT-Scores

## 1.2 COPD und Komorbiditäten

In einer Vielzahl von Studien wurde gezeigt, dass die COPD ein komplexes Krankheitsbild darstellt, das mehr beinhaltet als eine Obstruktion der Atemwege und eine Lungenüberblähung [Barnes & Celli, 2009]. So ergaben die Analysen einer amerikanischen Studie, dass die Häufigkeiten von Komorbiditäten sehr hoch waren und bei über 30% der Patienten mit COPD zumindest eine klinisch relevante Begleiterkrankung auftrat. Bei knapp 40% der Patienten konnten sogar zwei oder mehr Begleiterkrankungen festgestellt werden [Schneider et al., 2009].

Die Begleiterkrankungen von Patienten mit COPD weisen eine große Bandbreite auf und reichen von respiratorischen und kardiovaskulären über metabolische bis zu mentalen Erkrankungen [Hillas et al., 2015]. Diese Vielfalt führt zu erheblicher Inhomogenität innerhalb der COPD-Patienten, wie viele Studien belegen [Agusti et al., 2010]. Die Heterogenität der Komorbiditäten ist mitverantwortlich für die unterschiedlichen klinischen Verläufe von Patienten mit COPD trotz vergleichbarer Atemwegsobstruktion. Dies legt die Überlegung nahe, dass man Subgruppen von Patienten, die ähnliche klinisch relevante Charakteristika teilen, verschiedenen Phänotypen zuordnen kann [Burgel et al., 2014].

Ferner konnte gezeigt werden, dass Komorbiditäten die gesundheitsbezogene Lebensqualität der Patienten deutlich reduzieren [Huber et al., 2015], die Morbidität erhöhen und zu vermehrten Krankenhausaufenthalten, höherer Mortalität und höheren Ausgaben im Gesundheitssystem führen [Barnes & Celli, 2009]. Komorbiditäten stellen somit eine relevante Gesundheitsdeterminante dar. Das gleichzeitige Auftreten COPD-assoziiierter Krankheiten und altersassoziierter Beeinträchtigungen stellt für die Phänotypisierung eine besondere Herausforderung dar [Vetrano et al., 2016], da die COPD vermehrt im höheren Lebensalter auftritt.

Neben gemeinsamen genetischen Risikofaktoren ist ein möglicher Ansatz, das gemeinsame Auftreten von Komorbiditäten zu erklären, die Gemeinsamkeit von Risikofaktoren. Der bedeutendste extrinsische Risikofaktor ist das Rauchen, welches u.a. Veränderungen der Zellen und Strukturen von Organen fördert, die jenen biologischer Alterung ähneln. Typische Manifestationen sind eine Hautalterung, die vor allem im Gesicht auffallen kann, sowie kardiovaskuläre und zerebrovaskuläre Erkrankungen, deren Häufigkeit zugleich mit dem Alter zunimmt [Karrasch et al.,

2008]. Diese beiden Entitäten sind an der erhöhten Morbidität und Mortalität von Patienten mit COPD im Vergleich zu Patienten ohne COPD beteiligt. Als Folge sterben mehr COPD-Patienten an kardiovaskulären Ursachen als an respiratorischen Komplikationen [McAllister et al., 2007].

Einen Mediator für verschiedene COPD-assoziierte Erkrankungen stellt möglicherweise eine systemische Inflammation dar, die bei Atherosklerose, Kachexie, Anorexie und Osteoporose nachgewiesen wurde [Gan et al., 2004]. Eine derartige systemische Entzündungsreaktion wird sowohl für die Initiierung als auch die Verschlechterung von Komorbiditäten wie ischämischen Herzerkrankungen, normozytärer Anämie, Lungentumoren, Depression und Diabetes verantwortlich gemacht [Barnes & Celli, 2009]. Es ist jedoch nicht abschließend geklärt, ob es sich dabei eher um einen kausalen Faktor oder einen bloßen Marker des Geschehens handelt. Unabhängig davon legen die genannten Zusammenhänge nahe, dass es sinnvoll ist, molekulare und biochemische Marker der Alterung und Entzündung im Blut zu untersuchen und auf ihren Zusammenhang mit phänomenologischen und funktionellen Charakteristika sowohl der Alterung als auch der COPD zu prüfen.

Im Hinblick auf sowohl die Gesamtmortalität als auch speziell die kardiale Mortalität bei Rauchern und ehemaligen Rauchern stellt bereits die Lungenfunktion allein einen unabhängigen Prädiktor dar [Stavem et al., 2005]. Einzelne Untersuchungen fanden, dass hinsichtlich der Mortalität die Lungenfunktion etablierten Risikofaktoren für kardiovaskuläre Erkrankungen wie BMI, Serum-Cholesterin oder Blutdruck überlegen war [Karrasch et al., 2008]. Zugleich sind diese Risikofaktoren wesentlich an der Entstehung eines metabolischen Syndroms beteiligt, das nicht selten zusammen mit einer COPD auftritt [Stavem et al., 2005; Watz et al., 2009]. Vermutlich ermöglicht die Lungenfunktion vor allem die Beurteilung von strukturellen Prozessen, die mit einer biologischen Alterung der Lunge sowie des Gesamtorganismus einhergehen. Gleichwohl spiegelt beispielsweise FEV<sub>1</sub> auch hinsichtlich der Lunge nur einen Aspekt der biologischen Alterung wider, da für andere Funktionsparameter das Ergebnis anders ausfallen kann [Karrasch et al., 2018].

## 1.3 Alterung, Alterungsmarker, Hautalterung

### 1.3.1 Alterung

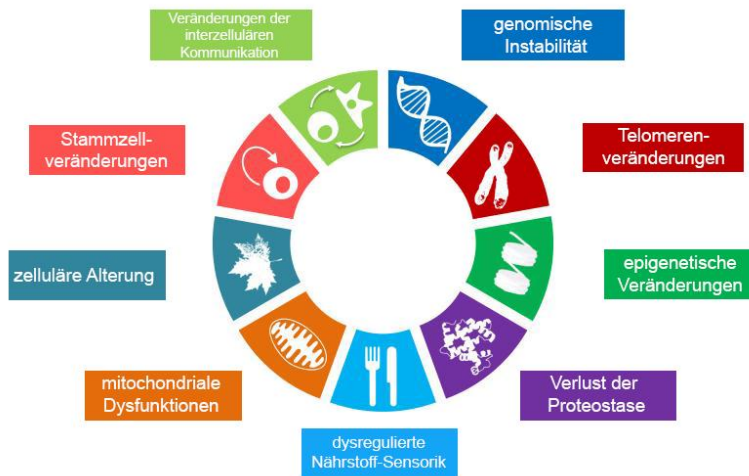


Abb. 1.2: Kennzeichen der Alterung. Die Abbildung illustriert verschiedene Mechanismen, welche den Alterungsprozess beeinflussen: zelluläre Alterung, Stammzellveränderungen, Veränderungen der interzellulären Kommunikation, genomische Instabilität, Telomerenveränderungen, epigenetische Veränderungen, Verlust der Proteostase, dysregulierte Nährstoff-Sensorik und mitochondriale Dysfunktionen; modifiziert nach Lopez-Otin et al., 2013

Alterung bzw. Altern ist ein Prozess, bei dem die physiologische Integrität eines Organismus mehr und mehr verloren geht, bis er über gesteigerte Vulnerabilität zum Tod führt. In den letzten Jahren erfuhr die entsprechende Forschung großen Aufschwung vor allem durch die Entdeckung, dass es sich bei der Alterung teils um einen kontrollierten Prozess handelt, der durch genetische Signalwege und biochemische Prozesse beschrieben werden kann, die im Laufe der Evolution über die Folge der Organismen weitgehend genetisch konserviert wurden [Lopez-Otin et al., 2013]. Die biologische Alterung umfasst eine Vielzahl von zellulären, molekularen und strukturellen Veränderungen. Vor allem kann sie auch vorzeitig, unabhängig vom chronologischen Alter, auftreten bzw. angestoßen werden; diesen Vorgang nennt man "induzierte Alterung" [Karrasch et al., 2008]. Die vorliegende Arbeit geht davon aus, dass eine vorzeitige Alterung für die COPD relevant ist. Im Folgenden werden einige der alterungsassoziierten Prozesse näher umrissen, hierbei wird auf jene Signalwege näher eingegangen, welche Gene bzw. Mechanismen betreffen, die in dieser Arbeit untersucht wurden.

## *Genomische Instabilität*

Ein gemeinsamer Nenner der Alterung ist die Akkumulation genetischer Schäden während des Lebens. Die Integrität und Stabilität der DNA wird kontinuierlich sowohl exogen durch physikalische, chemische und biologische Agenzien als auch endogen durch Fehler der DNA-Replikation, spontane hydrolytische Reaktionen und reaktive Sauerstoffspezies gefährdet. Aus diesem Grund haben die Organismen ein komplexes System von Reparaturmechanismen entwickelt [Lopez-Otin et al., 2013]. Deren herausragende Bedeutung zeigt etwa das Werner-Syndrom, bei dem ein Defekt in diesen Schutzmechanismen zu einer vorzeitigen Alterung führt [Sommers et al., 2019]. Das Werner-Protein spielt eine bedeutende Rolle beim Replikativen Stress und trägt zur Wiederherstellung von blockierten Replikationsgabeln bei, wobei die genauen Mechanismen noch nicht vollständig bekannt sind. Man weiß, dass das Protein Einfluss auf den Replikations-Kontrollpunkt hat, der für die Integrität und die Wiederherstellung der Replikationsgabel sorgt und von Kinasen wie ATM reguliert wird. Es konnte gezeigt werden, dass letzteres die Funktion von WRN in bestimmten Schritten des Arrests der Replikationsgabel moduliert [Picchieri et al., 2011]. Einen weiteren Schutzmechanismus v.a. gegen oxidativen Stress stellt die Katalase dar, kodiert durch das CAT-Gen, die als antioxidatives Enzym durch chemische Reaktionen Wasserstoffperoxide unschädlich machen kann [Nandi et al., 2019]. Ähnliches gilt für die Superoxid-Dismutase 2, welche toxische Peroxide u.a. in Wasserstoffperoxid umwandelt und somit die Zelle vor gefährlicheren Sauerstoff-Radikalen schützt [Rassow et al., 2012]. An dieser Stelle ist auch das Heterodimer Ku70/80 zu nennen, welches in der Reparatur von homologen Doppelstrangbrüchen eine bedeutende Rolle spielt und somit für die Integrität des Genoms mitverantwortlich ist [Fell & Schild-Poulter, 2012]. Alle diese Mechanismen spielen folglich eine wichtige Rolle bei Alterungsprozessen und wurden deshalb in der vorliegenden Arbeit untersucht.

Auch andere Schäden im Zellkern wie Aneuploidien und Variationen der Anzahl der Kopien wurden im Zusammenhang mit einer Alterung beobachtet. Die Instabilität des Genoms kann auch die DNA der Mitochondrien betreffen. So konnten Mutationen und Deletionen in der mtDNA, die sich mit der Zeit ansammeln, mit vorzeitiger Alterung und einer Verringerung der Lebensspanne in Verbindung gebracht werden [Huang & Manton, 2004]. Mitochondrien sind auch insoweit beteiligt, als ihr

Funktionsverlust zu einer Produktion von Sauerstoffradikalen führt, was wiederum Protein-, RNA- und DNA-Schäden nach sich zieht [Karrasch et al., 2008]. Ferner konnte gezeigt werden, dass Schäden in der Kernlamina zu einer Instabilität des Genoms führen können. Besondere Bedeutung kommen hier den Hauptbestandteilen der Kernlamina, den Laminen, zu, die für die Stabilität und somit den Schutz der Erbinformation hauptverantwortlich sind [Lopez-Otin et al., 2013]. Ferner regulieren Lamine verschiedene Prozesse im Nukleus wie den Proteintransport, die Genexpression, die DNA-Replikation und die DNA-Reparatur [Burke & Stewart, 2013]. So können Veränderungen dieser multifunktionellen Strukturproteine oder Schäden Einfluss auf Zellproliferation, Differenzierung, Apoptose und Alterung haben [Dechat et al., 2010]. Die Regulation dieser Zellkernaktivitäten läuft über Interaktionen zwischen den Laminen sowie Kernhüllproteinen, Transkriptionsfaktoren und Chromatin. Insgesamt ist etwa 40% des menschlichen Genoms in Lamin-assoziierten Domänen organisiert [Bickmore & van Steensel, 2013]. Außerdem konnte eine Studie ein Zusammenspiel zwischen Zelllamina und Reparaturmechanismen gegen oxidativen Stress aufzeigen, die bei der Entstehung von Tumoren und Alterungsprozessen eine Rolle spielen [Maynard et al., 2019]. Auch die Erschöpfung des Stammzellpotentials sowie der Verlust der Proteostase und der Telomeren spielen beim Alterungsprozess eine Rolle [Lopez-Otin et al., 2013]. Letztere gehören zu den schwer zu replizierenden Teilen der Chromosomen, die das Fortschreiten der Replikationsgabel behindern und somit unter Stress zu Instabilität der Chromosomen, Tumorwachstum und Alterungsprozessen führen kann. Einen Kontrollmechanismus dieser anfälligen Region stellt der Shelterin-Komplex dar. Hierzu zählt u.a. das telomerenspezifische Protein TERF2. In einer Studie konnte gezeigt werden, dass dieses Protein darüber hinaus auch für die Stabilität weiterer Heterochromatin-Regionen verantwortlich ist und somit für die Altersforschung von Interesse sein könnte. [Mendez-Bermudez et al., 2018]

### *Zelluläre Alterung*

Zelluläre Alterung ist ein Prozess, der durch verschiedene Arten von Stress ausgelöst werden kann und zu einem irreversiblen Arrest des Wachstums führt. Während des Alterungsprozesses sammeln sich gealterte Zellen zunehmend an und führen zu Strukturveränderungen, einer Alterung des Organismus sowie verschiedenen

alterungsabhängigen Erkrankungen. Diese Prozesse werden durch intrinsische und extrinsische Faktoren induziert [Regulski, 2017]. Der Zellzyklus wird von Zyklinen, zyklinabhängigen Kinasen (CDK) und deren Inhibitoren kontrolliert. Besondere Bedeutung kommt den CDK-Inhibitoren p16 und p21 zu. p21 wird vom Tumorsuppressor p53 kontrolliert, der eine bedeutende Rolle in der Induktion der zellulären Alterung spielt [Karrasch et al., 2008] und ebenfalls einen wichtigen Faktor bei der Verbindung von Signalwegen der zellulären Alterung mittels p53-Rb und p16-Rb darstellt [Si et al., 2018]. Außerdem kann dieses Protein den Alterungsprozess initiieren, vor allem über die Telomerenlänge, dieser Prozess wird dann von p16 fortgesetzt [Karrasch et al., 2008]. Des Weiteren spielt p21 auch eine wichtige Rolle bei der Alterung von Stammzellen, indem es diese zum einen vor genotoxischem Stress schützt, zum anderen durch Aktivierung zu einer Erschöpfung der Stammzellen bei verkürzten Telomeren führt [Ju et al., 2007]. So beeinflusst der Zellzyklusregulator den Alterungsprozess auf mehreren Ebenen und wurde deshalb in der vorliegenden Arbeit untersucht.

### *Epigenetische Veränderungen*

Neben den geschilderten Alterationen des Genoms sind alle Zellen und Gewebe während des Lebens auch epigenetischen Veränderungen unterworfen. Eine wichtige Rolle in Bezug auf Alterung und Langlebigkeit spielen die Sirtuine, eine Familie von Nicotinamid-adenindinukleotid(NAD)-abhängigen Proteindeacytelasen, die für die Antwort auf eine verringerte Nährstoffzufuhr und die indirekte Steuerung der Genexpression von Bedeutung sind [Karrasch et al., 2008]. Sirtuine (SIRT) modifizieren sowohl Transkriptionsfaktoren als auch nukleäre Proteine (Histone) und modulieren auf diese Weise die Ablesung des Genoms. Außerdem unterdrücken die Sirtuine Prozesse der zellulären Alterung durch einen verlangsamten Abbau der Telomeren, einen Schutz der Integrität des Genoms und eine Unterstützung bei DNA-Reparaturmechanismen [Lee, 2019]. Weitere epigenetische Mechanismen, vor allem über DNA-Methylierung und kurze RNAs, wurden in der vorliegenden Arbeit nicht näher untersucht.

### *Insulin, Insulin-like Growth Factor (IGF) und Nährstoff-Sensorik*

Für die Kontrolle des Alterungsprozesses ist der vermutlich wichtigste Signalweg jener von Insulin und IGF-1. Dies ist einer der in der Evolution am besten



konservierten Signalwege. Er greift über verschiedene Transkriptionsfaktoren in die nährstoffabhängige Regulation und antioxidative Abwehr sowie den Zellzyklus ein. Als wichtigste Vertreter sind jene der der FOXO-Familie zu nennen, die für verschiedene zelluläre Funktionen wie den Zellzyklusarrest, Zelldifferenzierung, DNA-Reparaturmechanismen, Langlebigkeit und Regulation des Metabolismus eine wichtige Rolle spielen [Tia et al., 2018] und somit als Alterungsmarker von Interesse sein könnten. Als Gegenspieler sind die bereits genannten Sirtuine zu nennen, die ebenfalls für das Signal des Nährstoffmangels zuständig sind [Karrasch et al., 2008] und bei einer durch Kalorienrestriktion induzierten Gewichtsabnahme vermehrt exprimiert werden [Crujeiras et al., 2008]. Dieser Mechanismus trägt beim Tier wesentlich zur Langlebigkeit bei [Karrasch et al., 2008]. Auch Klotho führt durch eine Inhibition des Insulin-like-Signalweges zu einem Anti-aging-Effekt [Dalton et al., 2017].

#### *Veränderte interzelluläre Kommunikation*

Zu den wichtigsten Ursachen veränderter interzellulärer Kommunikation gehören Entzündungsprozesse. Sie kommt durch verschiedene Mechanismen zustande, beispielsweise Akkumulation von Gewebeschäden, Beeinträchtigung des Immunsystems, vermehrte Ausschüttung von Entzündungsmediatoren, Aktivierung von Transkriptionsfaktoren, insbesondere NF- $\kappa$ B [Karrasch et al., 2008]. In diese Gruppe gehört unter anderem der Signal transducer and activator of transcription 3 (STAT3), der in dieser Arbeit untersucht wurde.

### **1.3.2 Marker im Blut**

Sowohl auf klinischer als auch auf zellulärer Ebene gibt es Hinweise, dass eine vorzeitige Alterung der Lunge und anderer Organe einen grundlegenden Mechanismus bei der Entstehung einer COPD darstellt [Karrasch et al., 2008; Lucke, 2015]. Entsprechend finden sich bereits bei Rauchern Zeichen einer vorzeitigen Alterung, die bei manifester COPD in der Regel stärker ausgeprägt sind. In dieser Arbeit wurden folgende Marker im Blut von Patienten mit COPD untersucht:

**WRN-Gen:** Dieses Gen (Werner Protein) kodiert für ein Protein mit einer dualen katalytischen Aktivität, nämlich als Helikase und als Exonuklease, und hat besondere

Bedeutung bei der Replikation, Rekombination und Reparatur von DNA. Letzteres ist besonders relevant für die Zellalterung, wie das Werner-Syndrom zeigt, bei dem ein Defekt des WRN-Genproduktes zu einer vorzeitigen Alterung und Reduktion der Lebenserwartung um 50 Jahre führt [Sommers et al., 2019].

**LMNA-Gen:** Dieses Gen (Lamin A/C) kodiert für strukturgebende Proteine, die Lamine, die für die Stabilität vor allem der inneren Kernhülle hauptverantwortlich sind und somit eine wichtige Rolle in der Organisation und dem Schutz des Genoms spielen. Eine bestimmte Mutation in diesem Gen führt zum Hutchinson-Gilford Progeria-Syndrom, das durch eine vorzeitige Alterung charakterisiert ist [Gonzalo et al., 2017].

**CDKN1A-Gen:** Dieses Gen kodiert für das Protein p21, einen Regulator des Zellzyklus, der zur Familie der CDK-Inhibitoren gehört. p21 ist ein wesentlicher Mediator für die p53-vermittelte Tumorsuppression und spielt ebenfalls eine wichtige Rolle bei der Verbindung von Signalwegen der zellulären Alterung mittels p53-Rb und p16-Rb [Si et al., 2018]. Des Weiteren kann dieses Protein, hauptsächlich über die Telomerenlänge, den Alterungsprozess initiieren, der dann von p16 fortgesetzt wird [Karrasch et al., 2008]. Ein Forscherteam konnte zeigen, dass bei Patienten mit COPD die Expression von p21 erhöht war [Rutten et al., 2016].

**SIRT1-Gen:** Dieses Langlebigkeits-Gen kodiert für eine NAD-abhängige Deacetylase, die Zellen gegen oxidativen Stress schützt, den Glucose- und Fettmetabolismus reguliert und die DNA stabilisiert [Kilic et al., 2015]. Somit schützt dieses Protein auf mehreren Ebenen die Zelle vor vorzeitiger Alterung. Dementsprechend ist es nicht verwunderlich, dass gemäß einer Studie aus dem Jahre 2016 die Genexpression von SIRT1 bei Patienten mit COPD signifikant erniedrigt war [Rutten et al., 2016]. Ferner waren bei Patienten mit COPD auch die Expression und Funktionalität von Sirtuinen im Serum erniedrigt [Yanagisawa et al., 2017].

**FOXO3-Gen:** Dieses Langlebigkeits-Gen kodiert für den Transkriptionsfaktor Forkhead box O-3, der in mehrere Signalwege eingreift. Von besonderer Bedeutung in Bezug auf Alterung sind dabei jene der Stressresistenz, des Metabolismus, des Zellzyklusarrestes und der Apoptose [Morris et al., 2015]. Es gibt in der Familie noch mehrere andere Transkriptionsfaktoren, jedoch ist FOXO3 vermutlich der wichtigste

im Zusammenhang mit der COPD und wurde daher in der vorliegenden Arbeit untersucht.

**Klotho-Gen:** Es kodiert für ein Typ-I-Transmembranprotein mit einer großen löslichen extrazellulären (beta-Klotho) und einer kleineren intrazellulären Domäne (alpha-Klotho). Der Antiaging-Effekt von alpha-Klotho beruht auf einer Inhibition des Insulin-like-Signalweges [Dalton et al., 2017]. In einer Studie konnte gezeigt werden, dass bei Patienten mit COPD die Konzentration von S-Klotho (löslich) signifikant erniedrigt war [Rutten et al., 2016], doch liegen hierzu insgesamt beim Menschen sehr wenige Daten vor.

**XRCC5-und XRCC6-Gen:** Diese Gene kodieren für das Heterodimer Ku70/80, das in der Reparatur von homologen Doppelstrangbrüchen eine bedeutende Rolle spielt und somit für die Integrität des Genoms verantwortlich ist. Zu Beginn dieser Reparaturkaskade steht ein Komplex aus mehreren Proteinen, der DNA-Schäden detektieren kann; hierzu gehört Ataxia Telangiectasia Mutated, kodiert vom **ATM-Gen** [Fell & Schild-Poulter, 2012]. Es ist daher nicht verwunderlich, dass bei Patienten mit COPD, bei denen es zu einer vorzeitigen Alterung kommt, die Konzentration des Anti-Aging Markers Ku70 verringert sein kann [Rutten et al., 2016].

**CAT-Gen:** Es kodiert für eine Katalase, die Wasserstoffperoxid ( $H_2O_2$ ) in  $O_2$  und  $H_2O$  umwandelt. Für die Entstehung von  $H_2O_2$  ist unter anderem die Superoxid-Dismutase 2 verantwortlich [Rassow et al., 2012], kodiert durch das **SOD2-Gen**, dessen Genprodukt toxische Peroxide u.a. in Wasserstoffperoxid umwandelt und somit die Zelle vor gefährlicheren Sauerstoff-Radikalen schützt [Rassow et al., 2012]. In einer Studie war die Expression von SOD2 signifikant niedriger bei COPD-Patienten im Vergleich zu Rauchern und Nichtrauchern (ohne COPD) [Rutten et al., 2016], doch ist diese Frage ungenügend untersucht. In der vorliegenden Studie wurden die beiden genannten Gene untersucht, da die entsprechenden Mechanismen ineinandergreifen.

**TERF2-Gen:** Es kodiert für ein telomerenspezifisches Protein, das Teil des Telomeren-Nukleoproteinkomplexes ist und eine Schlüsselrolle beim Schutz der Telomeren spielt [www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/7014, 2018]. Die Telomeren dienen in der vorliegenden Arbeit, ähnlich wie in vorhergehenden Arbeiten [Albrecht et al., 2014; Lucke, 2015; Karrasch et al., 2018], als Marker einer möglichen biologischen

Gesamtalterung.

**STAT3-Gen:** Es kodiert für ein Protein der STAT-Familie. Diese Proteine werden durch Phosphorylierung aktiviert, wandern in den Zellkern und fungieren dort als Transkriptionsaktivatoren für Gene, die eine wichtige Rolle für Zellwachstum und Apoptose spielen [<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/6774>, 2018]. Beide Faktoren sind in ihrem Zusammenspiel für eine Zellalterung wichtig.

**VEGFB-Gen:** Es kodiert für ein Protein der VEGF-Familie (vascular endothelial growth factor). Diese Proteine regulieren die Bildung von Blutgefäßen und sind in der Zellphysiologie des Endothels beteiligt [<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/7423>, 2018]. Aufgrund des Zusammenhangs von Alterung und Gefäßerkrankungen ist dieses Gen auch für die Alterung der Lunge interessant. Dies gilt umso mehr, als Gefäßänderungen möglicherweise zu den initialen Veränderungen bei der Entstehung eines Lungenemphysems zählen [Suzuki et al., 2008; Voelkel et al., 2011].

### 1.3.3 COPD und Hautalterung

Die Haut stellt das größte Organ des menschlichen Körpers und zugleich die Verbindung zwischen Körper und Umgebung dar. Somit ist die Haut nicht nur internen Alterungsprozessen, sondern auch äußeren Stressoren ausgesetzt [Gkogkolou & Böhm, 2012]. Dies hat Konsequenzen für die Auswahl von Hautbereichen für eine Analyse im Hinblick auf Alterung. Eine hauptsächlich endogen und systemisch gealterte Haut sollte am ehesten an wenig UV-exponierten Stellen wie der Innenseite des Armes zu beobachten sein. An anderen Stellen, wie beispielsweise dem Augenaußenwinkel, dürfte der interne Alterungsprozess durch exogene Faktoren wie UV-Strahlung, Chemikalien und andere Faktoren verstärkt, möglicherweise aber auch so überlagert sein, dass der endogene Anteil kaum noch zu erkennen ist [Gkogkolou & Böhm, 2012]. Dies war der Grund, warum in der vorliegenden Arbeit die Hautbeschaffenheit mittels Abdrücken an zwei Stellen untersucht wurde, anders als in den vorangegangenen Arbeiten [Lucke, 2015; Patel et al., 2006; Daniell 1971]. Auch bei der Auswertung von Fotos des Gesichts wurden neben den periorbitalen die nasolabialen Falten untersucht, da diese möglicherweise anders ausgeprägt sind.

Ein weiterer Mechanismus bei der Entstehung der COPD ist die Protease-Antiprotease-Imbalance. Raucher zeigen eine Hochregulation der Fibroblasten-kollagenase MMP-1 in der Haut, die eine Verringerung des interstitiellen Kollagens verursachen kann [Lahmann et al., 2001]. Metalloproteinasen sind bei der COPD in einer ganzen Reihe von Untersuchungen als verändert nachgewiesen worden [MacLay et al., 2012].

Eine wichtige Rolle im Zusammenhang mit Hautalterung kommt auch den AGEs (Advanced Glycation End Products) zu. Es konnte gezeigt werden, dass sich diese in der Haut im Laufe des Alterungsprozesses ansammeln [Gkogkolou & Bohm, 2012] und es parallel unter UVA-Strahlung zu einer Ausschüttung von Sauerstoffradikalen kommt, was wiederum zu einem Zellschaden führt [Masaki et al., 1997]. Aber auch unter physiologischen Bedingungen interagieren AGEs unspezifisch mit den Zellmembranen von Fibroblasten und beeinflussen auf diese Weise die Alterung der Haut [Okano et al., 2002]. AGEs haben ebenfalls Effekte auf die extrazelluläre Matrix. Sie siedeln sich im Kollagen und Elastin der Haut an und führen durch eine Fehlvernetzung der Faserproteine zu deren vermindertem Abbau und einer gestörten Hautregeneration. Ein wichtiger Mitspieler in den verschiedenen Signalwegen ist der AGE-Rezeptor selbst, der sich auch vermehrt in der menschlichen Haut befindet und durch die Stimulation des Transkriptionsfaktors NF- $\kappa$ B in das Geschehen eingreift. Unter UV-Strahlung wird der Rezeptor vermehrt exprimiert [Lohwasser et al., 2006]. Raucher wiesen im Vergleich zu Nichtrauchern eine erhöhte Konzentration von AGEs im Gewebe auf [Cerami et al., 1997]. Allerdings wurde in der vorliegenden Arbeit aus technischen Gründen [Lucke, 2015] darauf verzichtet, AGEs oder ihre Rezeptoren zu messen.

Elastische Fasern kommen nicht nur in der Haut vor, sondern sind auch für die Struktur anderer Organe wie Lunge und Blutgefäße von großer Bedeutung [Sandberg et al., 1981]. Es liegt daher nahe, diese Gewebe und die zu Grunde liegenden Mechanismen zu untersuchen. Tatsächlich konnte gezeigt werden, dass durch Rauchen bedingte Änderungen der Faltenbildung der Haut mit dem Auftreten einer Obstruktion der Atemwege assoziiert sind. So wiesen Patienten mit einer starken Faltenbildung im Durchschnitt auch einen niedrigeren Tiffeneau-Index auf [Lange & Schnohr, 1994]; andere Größen wie der Gasaustausch wurden nicht untersucht. In einer weiteren Studie wurde der Zusammenhang zwischen Emphysem

und Arterienversteifung, einer ebenfalls alters-assoziierten Veränderung, nachgewiesen [Maclay et al., 2012]. Ursächlich für die vorgezogene Alterung von Haut, Lunge und Gefäßen ist möglicherweise der vermehrte Abbau von Elastin und die Protease-Antiprotease-Imbalance [Maclay et al., 2012]. Eine Studie zeigte einen signifikanten Zusammenhang zwischen dem Grad der Hautfaltenbildung im Gesicht und der Verschlechterung von FEV<sub>1</sub> und COPD [Patel et al., 2006]. Auch der Zusammenhang zwischen den Hautfalten im Augenbereich und einem Emphysem konnte aufgezeigt werden. Eine vermehrte Faltenbildung im Gesicht könnte somit zugleich eine Disposition anzeigen, an einer COPD zu erkranken, und umgekehrt [Patel et al., 2006]. Der Vorteil der Bestimmung der Hautfalten als Alterungsmarker ist, dass sie auf nicht-invasivem Weg mittels definierter Scores, wie dem Daniell-Score, erfolgen kann [Daniell, 1971]. Ferner können Hautfalten nicht nur per Foto erfasst, sondern auch mit Abdrücken quantifiziert werden. Bislang liegt keine Studie vor, die erstens zusätzlich zu Fotos mit der Methode der Hautabgüsse gearbeitet und zweitens zwei unterschiedlich exponierte Hautbereiche bei Patienten mit COPD verglichen hat. Dies erfolgte in der vorliegenden Arbeit.

## **1.4 Replika (Abdrücke) der Hautoberfläche sowie Fotos**

Als wesentliche Parameter der Hautstruktur sind Oberflächentopographie und Hautrauheit zu nennen [Trojahn, 2016]. Die Topographie der Haut kann in verschiedene Strukturelemente gegliedert werden. Falten oder Furchen sind parallel verlaufende Eindellungen der Oberflächenstruktur. Sie entstehen in der Folge von Stress und entsprechen verschiedenen Aspekten der extrinsischen Hautalterung. Bei den Hautlinien kann man primäre und sekundäre Linien unterscheiden. Diese bilden eine netzartige Oberflächenstruktur, die aus drei-, vier- oder fünfeckigen Hautfeldern gebildet wird, welche als Polygone bezeichnet werden [Hashimoto, 2007]. Profilometrische Verfahren, wie die Replika-Technik, ermöglichen es, auf mechanische oder optische Weise die Parameter der Hautstruktur zu analysieren [Trojahn, 2016].

Die Replika-Technik ist ein nicht-invasives Verfahren, einen Negativ-Abdruck der Oberflächentextur der Haut zu erhalten [Caputo et al., 1990]. Auf diese Weise ist eine quantitative Beurteilung von zentralen Parametern der Oberflächenbeschaffenheit

der Haut möglich [Rubino et al., 2005]. Die Replika-Technik wird zweckmäßigerweise mit einer computerbasierten Bildverarbeitung kombiniert. Damit ist eine objektive Messung der Topographie der Haut möglich [Rubino et al., 2005]. In einer methodologischen Studie konnte eine gute Korrelation zwischen einer computerbasierten Analyse der Parameter der Abdrücke und einer klinischen Graduierung der Falten gezeigt werden [Yin et al., 2001<sub>a</sub>]. Somit ließ sich bestätigen, dass die Hautreplika-Technik ein objektives und effizientes Werkzeug in der Beurteilung der Hautbeschaffenheit und somit vermutlich auch einer vorzeitigen Hautalterung darstellt. In verschiedenen Studien [Quan et al., 1997; Edwards et al., 2003; Pirisinu & Mazzarello, 2015] wurde die Hautbeschaffenheit mittels Replikatechnik erfasst, um sie im Detail zu analysieren und Vergleiche zwischen Arealen, die in verschiedenem Ausmaß einer Sonnenlichtexposition ausgesetzt waren, ziehen zu können. So konnten Korrelationen zwischen den Hautparametern einerseits und verschiedenen Alterungsprozessen aufgezeigt werden, teilweise sowohl wurde sogar versucht, zwischen extrinsischer und intrinsischer Alterung zu unterscheiden.

Darüber hinaus ist die Erstellung und Bewertung von Fotos des Gesichts ebenfalls eine etablierte Technik, um die Beschaffenheit der Haut semiquantitativ zu beschreiben [Daniell, 1971; Carruthers et al., 2009; Lucke, 2015].

## **1.5 COSYCONET (German COPD and Systemic Consequences - Comorbidities Network)**

Die vorliegende Arbeit basiert auf Untersuchungen von Teilnehmern der COSYCONET-Studie. Hintergrund der COSYCONET-Studie ist die Untersuchung des Zusammenhanges zwischen der Lungenerkrankung COPD und den damit assoziierten Komorbiditäten mit dem Ziel, verschiedene COPD-Phänotypen zu identifizieren [Vanfleteren, 2013; Anderson & Macnee, 2009], einschließlich der Rolle der Alterung und verschiedener Expositionen. In Deutschland wurde die COSYCONET-Kohorte in 31 Studienzentren aufgebaut; sie wird seitdem longitudinal verfolgt, um den Krankheitsverlauf in Relation zu den Komorbiditäten genauer als bislang zu analysieren [Jörres et al., 2010; Karch, 2016]. Bis Ende 2013 konnten 2741 Patienten in die COSYCONET-Studie eingeschlossen werden, davon im Studienzentrum LMU-Campus Innenstadt München 151 Patienten [Lucke, 2015].

Von diesen Patienten stand ein Teil für die Analysen der vorliegenden Arbeit zur Verfügung. Die Erhebung sämtlicher Daten dieser Arbeit erfolgte im Rahmen der Tätigkeit als Study Nurse im Studienzentrum LMU München, Campus Innenstadt. Ein positives lokales Ethikvotum für COSYCONET und ein Ethikvotum für die Gesamtstudie liegt vor.

Aufgrund der Vorarbeiten war von besonderem Interesse, herauszufinden, in welcher Beziehung verschiedene Marker der phänotypischen und genotypischen Alterung untereinander sowie zu anderen klinischen Charakteristika stehen. Unter den Vorarbeiten konnte auf eine Arbeit zurückgegriffen werden, die bereits den Aspekt der Alterung von COPD-Patienten zum Gegenstand hatte [Lucke, 2015], ferner auf eine umfassende Literaturzusammenstellung und hypothesenerzeugende Arbeit [Karrasch et al., 2008], sowie eine Anzahl von experimentellen Arbeiten an Zellkulturmodellen [Jörres, 2006].

Somit ergab sich die Fragestellung der vorliegenden Arbeit, nämlich (1) mit einer quantitativen Technik (Hautabdrücke) phänomenologische Alterungsmarker der Haut verschiedener Körperregionen (lichtexponiert: Augenaußenwinkel, weniger lichtexponiert: Innenseite Unterarm) zu bestimmen sowie diese mit der Bewertung von Fotos des Gesichts zu vergleichen, (2) einen ausgewählten Satz von Genen, die für Alterung und Regeneration wichtig sind, auf ihre Expression im Blut zu bestimmen, sowie (3) als zentrale Frage die so erhaltenen Marker zu COPD-Charakteristika in Beziehung zu setzen, vor allem hinsichtlich eines Lungenemphysems. Als funktionaler Marker eines Emphysems diene zum einen die Diffusionskapazität der Lunge für Kohlenmonoxid, zum anderen eine aus vier Lungenfunktionsparametern errechnete Score-Funktion für das Vorliegen eines Emphysems [Kahnert et al., 2018].



## 2 Fragestellung

Beruhend auf den vorhergehenden Überlegungen waren folgende Fragestellungen die Grundlage der vorliegenden Arbeit:

- In welchem Zusammenhang stehen die Ergebnisse einer quantitativen Auswertung von Hautfalten mittels Replika-Technik zu den Auswertungsergebnissen von Fotos des Gesichts?
- In welchem Zusammenhang stehen die Ergebnisse der Replika-Technik zu den Charakteristika einer COPD, vor allem eines Lungenemphysems?
- Tritt eine Beziehung zu der Ausprägung der Hautfalten in unterschiedlicher Weise an Innenarm und Augenaußenwinkel zutage, d.h. an Lokalisationen, die vermutlich primär endogenen versus exogenen Alterungsfaktoren ausgesetzt sind?
- Gibt es analoge Zusammenhänge für die Parameter der Alterung, die semiquantitativ anhand von Fotos des Gesichts ermittelt werden können?
- Gibt es eine Beziehung zwischen einer Reihe von molekulargenetischen Markern, die für Alterung und Regeneration relevant sein könnten, zu den klinischen Charakteristika der COPD sowie der Alterung der Haut an Innenarm und Augenaußenwinkel?
- Gibt es analoge Beziehungen zu den Falten, die anhand von Fotos bestimmt werden können?

## **3 Material und Methoden**

### **3.1 Beschreibung von COSYCONET**

Die COSYCONET-Studie (COPD and Systemic Consequences - Comorbidities Network) befasst sich mit dem Krankheitsverlauf und klinischen Zustand von Patienten mit chronisch-obstruktiver Lungenerkrankung, speziell damit, wie dieser durch Komorbiditäten und andere systemische Manifestationen beeinflusst wird. Diese Informationen wurden in verschiedenen Visiten, zu denen die Patienten in festen Abständen eingeladen wurden, mittels Fragebögen und einer Reihe von Funktionstests gesammelt. Zu diesem Zweck wurden die Lungenfunktion, der Status des Herz-Kreislaufsystems, sowie die mentale und metabolische Verfassung und die körperliche Leistungsfähigkeit erfasst. Durch die Gewinnung von Blutproben konnten auch Parameter der systemischen Inflammation und der Alterung analysiert werden. Klassische Laborparameter wie Blutfette und Elektrolyte, das Blutbild und organ-spezifische Werte wurden direkt im Kliniklabor bestimmt. Die Patienten mussten folgende Ein- und Ausschlusskriterien erfüllen [Karch et al, 2016]:

#### **3.1.1 Einschlusskriterien**

- männlich oder weiblich
- Mindestalter 40 Jahre
- Diagnose einer COPD gemäß Arztbefund
- schriftliches Einverständnis vor Einschluss
- Fähigkeit, die Anforderungen des Studienprotokolls physisch und geistig zu erfüllen
- voraussichtlich verfügbar über eine Studiendauer von mindestens 18 Monaten und bereit zur Teilnahme an insgesamt mindestens 3 Visiten

### **3.1.2 Ausschlusskriterien**

- Zustand nach lungenchirurgischem Eingriff (z.B. Lungenvolumenreduktion um mehr als die Hälfte der Lunge, Lungentransplantation)
- Patienten mit bekannten Tumorerkrankungen der Lunge
- Mittel- bis schwergradige Exazerbation in den letzten 4 Wochen vor Einschluss (orale Corticosteroide, Antibiotika und/oder Krankenhausaufnahme erforderlich); in diesem Falle wurde die Terminierung verschoben, um die 4-Wochen-Frist einzuhalten
- Unfähigkeit zu gehen oder die Zielsetzung des Projektes zu verstehen

Nachfolgend werden die einzelnen Untersuchungen der Visiten beschrieben, Details können den Standard Operating Procedures (SOP) von COSYCONET entnommen werden [<http://www.asconet.net/html/cosyconet>].

### **3.1.3 Befragung und Vitalparameter**

Anamnese (Liste häufiger Komorbiditäten, Familienanamnese, Raucheranamnese, Inanspruchnahme von Gesundheitsleistungen)

- Demographie (Basisdaten, Beruf, vorangegangene Expositionen, Berufskrankheiten)
- Vitalparameter
- Medikation (aktuelle Medikation und Einnahmemodalitäten, Medikationshistorie)
- Atemnot (mMRC – modified Medical Research Council)
- Beurteilung der COPD (CAT-Score – COPD Assessment Test)
- Krankheitsspezifische Lebensqualität (SGRQ 18 – St George's Respiratory Questionnaire)
- Generische Lebensqualität (EQ-5D – EuroQol)

- Körperliche Aktivität (IPAQ – International Physical Activity Questionnaire )
- Depression und Angst (PHQ – Patient Health Questionnaire)
- Osteoporose (FRAX – Fracture Risk Assessment Tool)

Die Komorbiditäten wurden anhand eines strukturierten Fragebogens erfasst. Auch der Raucherstatus und weitere Informationen wurden auf diese Weise erhoben. Die Erhebungsbögen sind den SOPS auf der Homepage von COSYCONET zu entnehmen.

Die Einnahme der aktuellen Medikamente wurde mittels einer strukturierten Tabelle erfasst. Um sicherzustellen, dass die verordneten Medikamente und deren Dosis mit den Angaben der Patienten übereinstimmten, waren die Patienten dazu angehalten, bei jeder Visite alle Packungen der eingenommenen Medikamente mitzubringen. Hierbei wurde der Begriff des Medikamentes sehr weit gefasst und umfasste z.B. auch Nahrungsergänzungsmittel.

### **3.1.4 Untersuchungen**

Anthropometrie (Größe, Gewicht, Bauchumfang, Hüftumfang, Oberschenkelumfang)

- Post-bronchodilatatorische Ganzkörperplethysmographie und Ruhespirometrie
- Post-bronchodilatatorische forcierte Spirometrie
- Post-bronchodilatatorische CO-Diffusionskapazität
- Blutdruck/Knöchel-Arm-Index (ABI)
- 6-Minuten-Gehtest (6MWD)
- Timed-up-and-Go-Test
- Kognitive Beeinträchtigung (DemTect)
- Bioimpedanz (BIA)
- Blutgase ( $\text{SaO}_2$ ,  $\text{PaO}_2$ ,  $\text{PaCO}_2$ , pH, BE,  $\text{CaO}_2$ )
- Blutentnahme für Biobank und vorliegende Studie
- Ruhe-EKG
- Ruhe-Echokardiographie (extern)

Nachfolgend werden alle Messungen beschrieben, die für die Auswertung und Analyse der Daten dieser Arbeit von Bedeutung waren. Alle weiteren Untersuchungen sind auf der Homepage von COSYCONET beschrieben.

### *Anthropometrie*

Das Körpergewicht wurde mit einer geeichten Körperwaage gemessen. Vor der Messung wurde der Patient angehalten, Schuhe und schwere Kleidung auszuziehen. Die Körpergröße wurde mittels Messlatte erfasst: Der Patient wurde gebeten, sich aufrecht hinzustellen und den Kopf gerade zu halten. Mit diesen zwei Werten wurde der Body-Mass-Index (BMI) in konventioneller Weise berechnet. Der Taillen- bzw. Bauchumfang wurde mit einem Messband am stehenden Patienten und freiem Oberkörper gemessen. Die Messung erfolgte an der schmalsten Stelle zwischen dem Oberrand des Beckenkamms und dem unteren Rippenbogenrand. Auch der Hüftumfang wurde mit einem Maßband gemessen, und zwar an der kräftigsten Stelle der Hüfte am entkleideten Patienten. Das Verhältnis von Taille zu Hüfte wird „Waist-to-Hip-Ratio“ genannt und kann genutzt werden, um die Verteilung des Körperfetts zu beschreiben.

### *Lungenfunktion*

Die Ganzkörperplethysmographie und die Ruhespirometrie erfolgten, um die statischen Volumina der Lunge sowie den (spezifischen) Atemwegswiderstand zu bestimmen. Zur Messung wurde das Gerät MasterScreen der Firma Erich Jaeger (Viasys, Vyaire; Höchberg) verwendet. Vor jeder Messung erfolgte eine Kalibrierung des Gerätes. Jeder Patient erhielt vor der Durchführung der Messungen eine Bronchodilatation mittels Inhalation von 400 µg Salbutamol und 80 µg Ipratropiumbromid. Diese erfolgte zwischen 30 Minuten und zwei Stunden vor Durchführung der Messungen. Die Bestimmung der Lungenfunktion folgte den ERS/ATS Guidelines sowie den Empfehlungen der Deutschen Atemwegsliga [Wanger et al., 2005; Criée et al., 2009]. Folgende Parameter wurden gemessen: totaler spezifischer Atemwegswiderstand (sR<sub>tot</sub>), effektiver spezifischer Atemwegswiderstand (sR<sub>eff</sub>), Intra-thorakales Gasvolumen (ITGV) am Ende einer normalen Ausatmung (=FRC), Expiratorisches Reservevolumen (ERV), Inspiratorische Vitalkapazität (IVC), Totale Lungenkapazität (TLC), Residualvolumen (RV) und Inspiratorische Kapazität (IC).

Zur weiteren Charakterisierung der Atemwegsfunktion erfolgte eine forcierte Spirometrie, und es wurde eine Fluss-Volumen-Kurve bestimmt. Hierfür wurde ebenfalls das Gerät MasterScreen verwendet. Auch hierfür galten die ERS/ATS Guidelines [Miller et al., 2005; Criée et al., 2015]. Folgende Parameter wurden erfasst: Forcierte Vitalkapazität (FVC), Forciertes Einsekundenvolumen ( $FEV_1$ ) und der Quotient  $FEV_1/FVC$  (Tiffeneau-Index).

Um das Sauerstoffaufnahmevermögen der Lunge zu bestimmen, wurde die Diffusionskapazität für Kohlenmonoxid (CO) gemessen. Auf diese Weise konnte getestet werden, wie gut der Übertritt von CO aus der Einatemluft in das Blut funktionierte. Für die Messung wurde das Gerät MasterScreen Diffusion der Firma Erich Jaeger (Viasys, Vyair; Höchberg) verwendet. Auch diese Messung erfolgte nach der Bronchodilatation und gemäß den Empfehlungen [Macintyre et al., 2005]. Folgende Parameter wurden erhoben: Transferfaktor für CO (TLCO, Diffusionskapazität), Alveolarvolumen (VA), Transferkoeffizient für CO ( $KCO=TLCO/VA$ , Krogh-Faktor), zur Qualitätskontrolle auch die Atemanhaltezeit (TA).

#### *Ankle-Arm-Index*

Der Knöchel-Arm-Index (Ankle-Brachial-Index (ABI)) wurde bestimmt, um mögliche vaskuläre Veränderungen auf nicht-invasive Weise zu erfassen. Hierfür wurde das Gerät VASCASSIST der Firma Isymed GmbH benutzt. Die Messung erfolgte gemäß den SOPs von COSYCONET beidseitig. Als Endergebnis galt der Mittelwert.

#### *Blutentnahme*

Für die Blutentnahme wurde eine oberflächliche Vene punktiert. In den meisten Fällen wurde hierfür eine Ellenbeugenvene herangezogen, in wenigen Fällen auch andere Venen. Die Punktion erfolgte mit einer Flügelkanüle, im Anschluss daran wurden mittels zweier verschiedener Abnahmesysteme mehrere Röhrchen gefüllt. Für das Kliniklabor wurden EDTA und Heparin-Röhrchen abgenommen. Für die Biomaterialbank von COSYCONET und die vorliegende Studie wurden EDTA-Blut, Citrat-, Serum-, und PAXgene-Röhrchen (RNA) gesammelt. Die Probenröhrchen wurden gleich nach der Blutentnahme langsam geschüttelt und gemäß den SOPs weiterbehandelt.

Im Labor des Klinikums wurden folgende Laborwerte bestimmt: Kreatinin Blut [mg/dl], Harnsäure [mg/dl], Harnstoff-N [mg/dl], Kreatinin Urin [mg/dl], Gesamtcholesterin [mg/dl], Triglyzeride [mg/dl], LDL [mg/dl], HDL [mg/dl], CRP [mg/dl], Leukozyten [ $10^9/l$ ], Erythrozyten [ $10^{12}/l$ ], Hämoglobin [g/dl], Hämatokrit [l/l], Thrombozyten [ $10^9/l$ ], Segmentierte [%], Eosinophile [%], Basophile [%], Monozyten [%], Lymphozyten [%], Glucose [mg/dl], HbA1c [%] und Alpha-1-Antitrypsin [mg/dl].

In den Standard Operating Procedures (SOPs) der COSYCONET-Studie sind alle Untersuchungen und Funktionstests und deren Abläufe genau beschrieben. Alle Fragebögen und Untersuchungen folgten den SOPs.

### *Bestimmung der Blutgase*

Vor der Messung wurde dem Ohrläppchen jedes Patienten eine durchblutungsfördernde Salbe (Finalgon®) einmassiert. Nach einer Einwirkzeit von 10 Minuten wurde mittels Lanzette eine Kapillare punktiert, das Blut in einem Kapillarröhrchen gesammelt und analysiert. Für die Messung wurde das Gerät ABL800 BASIC der Firma Radiometer verwendet. Folgende Parameter wurden bestimmt: pH, PaCO<sub>2</sub>, PaO<sub>2</sub>, Basenüberschuss (BE) und Sättigung SaO<sub>2</sub>. Daraus wurde der Sauerstoffgehalt CaO<sub>2</sub> berechnet.

## **3.2 Patientenkollektiv**

Das Studienzentrum München konnte initial (Visite 1) von September 2010 bis Dezember 2013 insgesamt 151 Patienten für die Studie rekrutieren. Die Zahl der Patienten nahm über die Folgevisiten ab. Für die vorliegende Studie wurden von 46 Patienten während der Folgevisiten 4 und 5 Daten gesammelt; während dieser Zeit fungierte die Autorin dieser Arbeit als Study Nurse. Sowohl für die Gesamtstudie als auch für die LMU-Subkohorte lagen Einwilligungserklärungen der Patienten vor.

Von den zum Standardprogramm gehörigen Untersuchungen der COSYCONET-Studie wurden einige dafür verwendet, um Korrelationen mit Parametern zu suchen, die speziell in dieser Arbeit untersucht wurden. Von besonderer Bedeutung waren anamnestische Daten zum Raucherstatus, anthropometrische Messdaten zur Bestimmung des BMI, das Alter, Lungenfunktionsmessgrößen, Blutgasparameter und Laborparameter.

Zusätzlich zu den Daten, die innerhalb des Standardprogramms für die COSYCONET-Studie gesammelt wurden, wurde folgendes Material gewonnen:

- 2,5 ml Blut in PaxGene-Röhrchen zur Bestimmung der Expression verschiedener Alterungs- und Regenerationsgene,
- Hautabdrücke vom Augenaußenwinkel und der Innenseite des Unterarms,
- Fotografische Aufnahmen des Gesichts, um das Faltenrelief der Augenwinkelregionen und der Nasolabialregion auszuwerten.

Eine ausführlichere Beschreibung der einzelnen Untersuchungen erfolgt nachfolgend.

### 3.3 Herstellung von Hautreplika und deren Auswertungen

Zur Herstellung der Abdrücke wurde das Proben-Kit Silflo verwendet. Zuerst wurde die Silikonmasse aus dem „Impression Material“ und dem „Catalyst“ auf einer transparenten Folie mit einem Spatel zusammengerührt, bis die gewünschte Konsistenz erreicht war. Das Set enthielt auch einen „Thinner“, der die Möglichkeit bot, die Masse bei Bedarf zu verdünnen.

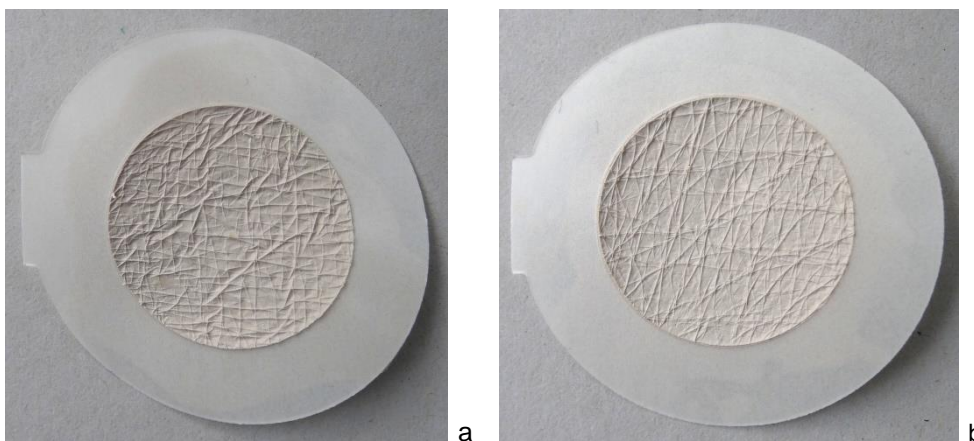


Abbildung 3.1 a und b: Beispiele von Hautabdrücken des Innenarms. Zu sehen ist das Replikat im inneren Kreis mit den Strukturen der Haut sowie der Rahmen in Form eines Ringes, der für die Stabilität und Handhabung wichtig war



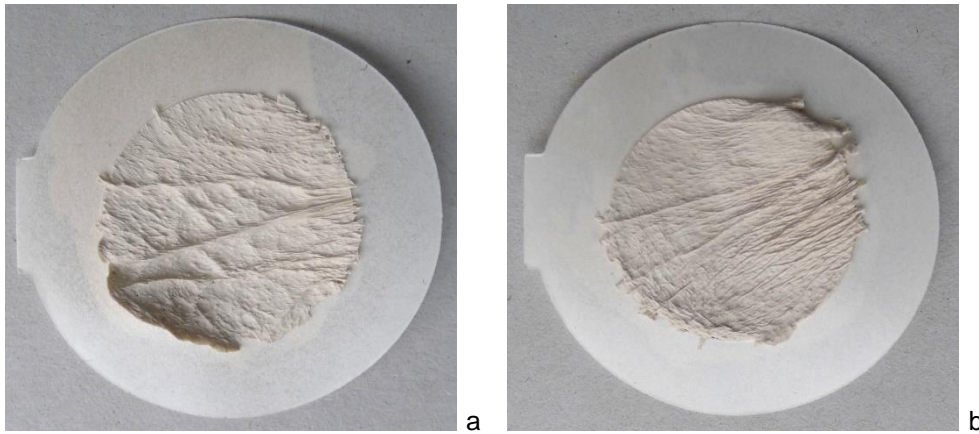


Abbildung 3.2 a und b: Beispiele von Hautabdrücken des Augenaußenwinkels. Zu sehen ist das Replikat im inneren Kreis mit den Strukturen der Haut sowie der Rahmen in Form eines Ringes, der für die Stabilität und Handhabung wichtig war. Im Vergleich zu Abbildung 3.1 ist die deutlich geänderte Textur zu erkennen, die durch grobe Falten gekennzeichnet ist

Von jedem Patienten wurden zwei Abdrücke (vgl. Abb. 3.1 und 3.2) hergestellt: einer am rechten Augenaußenwinkel und der andere auf der Innenseite des rechten Unterarms. Hierfür lagen die Patienten mit geschlossenen Augen auf der Untersucherliege und hielten den Unterarm derart, dass die Innenseite nach oben wies. Zuerst wurde auf die zu messenden Stellen ein selbstaftender Kleberahmen aufgebracht und anschließend die angerührte Masse dünn und gleichmäßig aufgetragen. Nach etwa 5 Minuten war die Masse getrocknet und die Abdrücke konnten abgelöst werden. Sie wurden im Kühlschrank bis zur quantitativen Auswertung gelagert.

Die quantitative Auswertung erfolgte mit dem Gerät "Optisches 3D-Messgerät MikroCADzoom" und der Software "ODSCAD 6.3" bzw. "PRIMOS 5.7" (LMI/GFMesstechnik GmbH, Berlin). Die Abdrücke wurden auf eine zuvor markierte Stelle auf die Auflageplatte gelegt. Mit Hilfe der eingebauten Kamera und dem Menüpunkt *Livebild* erfolgte die Feineinstellung der richtigen Positionierung. Hierfür wurde das Messobjekt mittels eines eingblendeten und eines projizierten Fadenkreuzes fokussiert. Anschließend konnte die Messung starten und das farbkodierte 3D-Höhenbild gespeichert werden.

Für die Auswertung der auf diese Weise entstandenen Bilddateien wurde die Software "PRIMOS 5.7" bzw. "ODSCAD 6.3" verwendet. Zuerst wurde ein Inversbild erstellt, um die Falten der Haut und nicht das Negativbild des Abdruckes auszuwerten. Mit der Funktion *Invalid entfernen* konnten fehlende Höhenwerte in den Messdaten ergänzt werden und somit „Löcher“ geschlossen werden. Diese Funktion wurde zwar bei jeder Messung standardmäßig angewendet, der Großteil der

Abdrücke war aber vollständig. Im Anschluss daran wurden verschiedene Filterfunktionen ausgeführt. Der Gauß-Filter 3x3 wurde für eine leichte Glättung der Messdaten verwendet, um sehr starke Gradienten, die eventuell in den Messdaten vorhanden waren, zu verringern. Der robuste Hochpass-Filter diente dazu, die Gesamtform (Biegung) aus den Messdaten zu entfernen, damit die Auswertung vom Programm nur an der lokalen Struktur erfolgte.

Für die Auswertung der Falten am Augenaußenwinkel wurde die Softwarefunktion *Faltenanalyse* verwendet, zur Auswertung der Faltenstruktur des Arms wurden verschiedene Rauheitsparameter mit der Funktion *Flächenrauheit* analysiert. Hierfür wurden die genannten Optionen ausgewählt, die Berechnungen erfolgten durch das Programm. Die Abdrücke vom Auge und vom Innenarm mussten aufgrund ihrer unterschiedlichen Beschaffenheit verschieden ausgewertet werden.

### **3.4 Fotografische Aufnahmen der Haut und deren Auswertung**

Bei den Visiten wurden von jedem Patienten eine Frontal- und zwei Halbprofil-aufnahmen von der linken und rechten Gesichtshälfte angefertigt. Es wurde für alle Aufnahme dieselbe Kamera verwendet (Sony Cybershot, 10 x Optical Zoom - Zeiss, 10,1 MegaPixel, DSC-H20) und beim Fotografieren immer unverändert die P-Modus-Programmautomatik angewendet. Ferner wurde ein höhenverstellbares Stativ verwendet, auf dem die Kamera befestigt wurde, um die Standardisierung der Aufnahmen zu gewährleisten. Um eine möglichst gleichmäßige Beleuchtungssituation zu schaffen, wurde eine indirekte Beleuchtung verwendet.

Jedem Patienten wurden 5x5-mm-Gitternetze auf die Wangen geklebt, die bei der anschließenden Beurteilung als Maßstab dienten. Es wurde dabei darauf geachtet, diese Stelle so zu wählen, dass keine Falten verdeckt wurden. Darüber hinaus wurde versucht, standardisierte Lichtverhältnisse im Raum zu schaffen, allerdings bestand kein Einfluss darauf, wie groß der Tageslichteinfall durch den zugezogenen Vorhang war.

Die Auswertung der Fotografien erfolgte durch drei unabhängige Auswerter (V.G., T.L., A.K.); zur Analyse wurde der Mittelwert der Scores gebildet. Für die Beurteilung der nasolabialen (NL) sowie der periorbitalen (PO, Krähenfuß-Region) Falten wurden

diese in Schweregrade von 0-4 (0=keine Falten; 4=schwere Falten) eingeteilt. Das Vorgehen folgte den internationalen Empfehlungen zur Auswertung derartiger Fotos [Carruthers et al., 2008; Rzany et al., 2012; Carruthers et al., 2012; Flynn et al., 2012; Narins et al., 2012].

## **3.5 Alterungsmarker im Blut**

### **3.5.1 Probennahme und RNA-Isolierung**

Die Bestimmung der Expression verschiedener mit der biologischen Alterung in Verbindung gebrachter Gene erfolgte bei jedem Probanden über das Material eines PAXgene™-Röhrchens. Dieses wurde immer als letztes der Blutproberöhrchen abgenommen und nach der Abnahme für 2 Stunden bei Raumtemperatur inkubiert. Die Lagerung der Blutproben fand anschließend bei -20°C statt.

Die Aufarbeitung der Blutproben folgte einer Kurzanleitung (siehe Anhang, Kapitel 7.2), die mit laboreigenen Modifikationen verbessert wurde. Die RNA-Isolierung erfolgte mittels des Maxwell®16 MDx-Gerätes (Promega). Bei diesem Gerät wurde die Nukleinsäure-Isolierung über die Bindung der RNA an paramagnetische Partikel erreicht. Die dafür eingesetzten Reagenzien stammten aus dem Maxwell®16 miRNA Tissue Kit (Promega).

Im Anschluss an die Isolierung der RNA erfolgte die RNA-Quantifizierung mittels Fluoreszenz-Spektroskopie (QuantiFluor RNA System, Promega) gemäß Herstelleranleitung. Die restliche RNA wurde aliquotiert und in Flüssigstickstoff gelagert.

### **3.5.2 Transkription**

Zur Umschreibung der isolierten RNA in cDNA wurde die RNA aus dem Flüssigstickstoff genommen und auf Eis aufgetaut. Für die Transkription wurde das iScript gDNA Clear cDNA Synthesis Kit (Bio-Rad) gemäß Herstelleranleitung verwendet, jedoch ergänzt um laboreigene Modifizierungen. Je Einzelansatz wurde 1 µg Probanden-RNA umgeschrieben.

Die so gewonnene cDNA wurde in Aliquots abgefüllt und bis zur Verwendung in der

Real-Time PCR bei -20°C gelagert. Zwei gepoolte cDNA Probanden-Proben dienten als Kontrollproben. In cDNA umgeschriebene RNA (Human XpressRef Universal Total RNA, Qiagen) wurde für die Standardkurven verwendet.

### **3.5.3 Real-Time-PCR**

Die Quantifizierung der cDNA erfolgte mit SYBR®Green. Dabei wird durch spezifische Primer ein signifikantes Stück cDNA amplifiziert. Durch die bekannte Menge RNA, die bei der Transkription eingesetzt wurde, erlaubte dies den Rückschluss auf die in der Originalprobe enthaltene RNA-Menge.

Die Real-Time PCR-Messungen erfolgten unter Verwendung von 96-Well-Platten mit dem CFX96™ Real-Time System / C1000™ Thermal Cycler, dem SsoAdvanced™ Universal SYBR®Green Supermix, sowie den PrimePCR Assay- und den PrimePCR Control Assay-Primern (Bio-Rad). Bei jeder 96-Well-Platte liefen eine frisch hergestellte Standardkurve, eine No-Template-Kontrolle und die beiden Probanden-Kontrollproben mit.

Die Standardkurve, Kontroll-Proben und Probanden-Proben wurden in Triplikaten und dem Assay angepassten Verdünnungen auf die gekühlten 96-Well-Platten aufgetragen. Anschließend wurde der - nach Vorgaben des Herstellers angesetzte - Master-Mix aus Supermix, Primern und nukleasefreiem Wasser zugegeben. Die Messung der 96-Well-Platten erfolgte nach dem empfohlenen Temperaturprogramm des SsoAdvanced™ Universal SYBR®Green Supermix, mit anschließendem Programmteil zur Bestimmung der Schmelzkurven.

Um die Qualität der RNA, Transkription und PCR zu prüfen, wurden folgende Kontrollmessungen mittels Real-Time-PCR in allen umgeschriebenen Proben durchgeführt:

- Positive PCR-Kontrolle: Diese basierte auf dem Nachweis einer synthetischen DNA-Matrize, um in den einzelnen Proben Störungen (PCR-Inhibitoren o.Ä.) zu finden, die den Ablauf der PCR-Reaktion beeinflussten.
- Reverse Transkriptions-Kontrolle: Hierbei wurde vor der reversen Transkription jeder RNA-Probe eine synthetische RNA beigefügt und auf diese Weise durch deren Nachweis als cDNA mit einer Real-Time PCR die Qualität der Umschreibung überprüft.
- Prüfung auf DNA (gDNA)-Kontamination: Die spezie-spezifische Kontrolle sprach auf einen nicht umgeschriebenen Teil des Genoms an. Damit konnte die Kontamination der einzelnen Probe mit gDNA quantifiziert werden.
- RNA-Qualitäts-Kontrolle: In zwei separaten Real-Time PCR-Reaktionen wurden zwei verschiedene Primer-Sets verwendet, welche dieselbe cDNA-Kopie an unterschiedlichen Stellen und mit unterschiedlichen Amplikon-Längen abschrieben, was wiederum auf die Integrität der RNA-Proben schließen ließ.

Folgende Ziel-Gene wurden analysiert (siehe Abkürzungsverzeichnis und Einleitung):

- |          |         |         |
|----------|---------|---------|
| • ATM    | • LMNA  | • VEGFB |
| • CAT    | • SIRT1 | • WRN   |
| • CDKN1A | • SOD2  | • XRCC5 |
| • FOXO1  | • STAT3 | • XRCC6 |
| • KL     | • TERF2 |         |

Folgende Normalisierungs-Gene wurden verwendet:

- HPRT1
- PPIA
- RPLP0
- SDHA
- YWHAZ

### 3.5.4 Aufbereitung und Ergebnisberechnung der gemessenen Rohdaten

Nach der Überprüfung der DNA-Schmelzkurven wurden die Standardkurven der einzelnen Platten gesichtet. Bei den gemessenen Standardkurven lag die Effizienz zwischen 92,4 und 108,8% und das Bestimmtheitsmaß zwischen 0,988 und 1,000 ( $R^2$ ). Die Software des verwendeten Real-Time Thermocyclers bestimmte automatisch den idealen Schwellenwert zur Berechnung der Cq-Werte.

- Um die Vergleichbarkeit der Messungen des gleichen Gens auf mehreren 96-Well-Platten zu erhöhen, mussten die automatisch ermittelten Schwellenwerte jeweils auf den Mittelwert nivelliert werden.
- Aus den Cq-Werten der Dreifach-Messungen der Kontrollen- und Probanden-Proben wurde jeweils der Mittelwert gebildet. Die beiden Kontrollproben von jeder 96-Well-Platte wurden ebenfalls gemittelt (Platten-Kontrollwert).
- Aus jedem der gemittelten Probanden-Cq-Werte und dem dazugehörigen Platten-Kontrollwert wurde ein Quotient gebildet, und die so erhaltenen Werte wurden mit dem Quotienten aus  $2/\text{Effizienz}$  der betreffenden Platte multipliziert.
- Dann wurde aus jedem so nivellierten Cq-Wert der Ziel-Gene für jede einzelne Probe, mit den nivellierten Cq-Werten der Normalisierungs-Gene der gleichen Probe, ebenfalls ein Quotient errechnet.

Das bedeutet, dass für jede Probanden-Probe 14 Ziel-Gene und 5 Normalisierung-Gene gemessen wurden. Die so erhaltenen 5 normalisierten Werte pro Ziel-Gen und Probe wurden schließlich durch einen geometrischen Mittelwert zusammengefasst und sodann statistisch analysiert. Insgesamt lief die Normalisierungs-Berechnung auf folgende Formel hinaus:

$$N = \frac{\left( \frac{Cq_{\text{Ziel-Gen 1}}^{\text{Probe 1 \setminus Platte A}}}{Cq_{\text{Ziel-Gen 1}}^{\text{Kontrolle \setminus Platte A}}} \times \left( \frac{2}{E_{\text{Platte A}}} \right) \right)}{\left( \frac{Cq_{\text{Norm.-Gen 1}}^{\text{Probe 1 \setminus Platte B}}}{Cq_{\text{Norm.-Gen 1}}^{\text{Kontrolle \setminus Platte B}}} \right) \times \left( \frac{2}{E_{\text{Platte B}}} \right)}$$

### 3.6 Berechnungen von Parametern

Um die gemessenen Daten der Lungenfunktions- sowie Diffusionskapazitätsmessungen nach Größe, Geschlecht und Gewicht zu normieren, wurden die Referenzwerte der Global Lung Function Initiative (GLI) [Quanjer et al., 2012; Stanojevic et al., 2017] verwendet. Hierzu wurden die vorprogrammierten Excel-Sheets verwendet. Für die anderen Parameter wurden die EGKS-Sollwerte verwendet [Crieé et al., 2009].

Da für die Fragestellung der vorliegenden Arbeit auch das Vorhandensein eines Lungenemphysems von Interesse war, entsprechende CT-Daten jedoch nur bei wenigen Patienten vorlagen, wurde zusätzlich ein Emphysemscore aus verschiedenen Messwerten der Lungenfunktion berechnet, analog einer vorangegangenen Arbeit [Kahnert et al., 2018]. Für die Berechnung dieses Scores wurde die Formel modifiziert, da inzwischen neue Sollwerte für die Diffusionskapazität zur Verfügung standen [Stanojevic et al., 2017]. Die Berechnung erfolgte mit den Daten der vorhergehenden Arbeit [Kahnert et al., 2018], mit dem Unterschied, dass die neuen Sollwerte verwendet wurden. Analog dieser Arbeit wurde eine Score-Funktion mittels linearer Diskriminanzanalyse bestimmt. Auf dieser Basis ergab sich folgende Formel:

$$\text{Score} = -4,505 + 2,275 * \log_{10}(\text{sRaweff}) + 0,030 * \text{KCO\%Soll} - 0,007 * \text{RV\%Soll} + 0,051 * \text{FEV}_1/\text{FVC}.$$
 Wenn der Score negativ war, galt dies als Hinweis auf das Vorliegen eines Emphysems, wenn der Score positiv war, als Hinweis auf das Nicht-Vorliegen eines Emphysems.

Des Weiteren wurde für die Analysen der Sauerstoffgehalt des Blutes,  $\text{CaO}_2$ , in ml pro 100ml Blut berechnet, und zwar wie folgt:  $\text{CaO}_2 = (1,34 * \text{Hb} * \text{SaO}_2) + (0,0031 * \text{PaO}_2)$  [Trudzinski et al., 2019].

### 3.7 Datenauswertung

Zur Analyse der Daten wurden Mittelwerte (MW) und Standardabweichungen (SD) herangezogen, wenn die Verteilung der Daten dies zuließ. Außerdem wurden Mediane, Minima und Maxima verwendet. Der unpaarige t-Test oder der Mann-Whitney-U-Test dienten dazu, Werte zweier Gruppen miteinander zu vergleichen. Zum Vergleich von mehr als zwei Gruppen wurde eine entsprechende Einweg-Varianzanalyse (ANOVA) genutzt. Für die Analyse des Zusammenhangs zwischen kontinuierlichen Variablen fand die einfache oder multiple lineare Regressionsanalyse Anwendung. Der Zusammenhang einer binären Variablen mit kontinuierlichen oder kategorialen Variablen wurde mittels der logistischen Regressionsanalyse analysiert. Zur Bestimmung der Korrelationsstärke zweier Variablen wurde der lineare Korrelationskoeffizient nach Pearson oder der Rangkorrelations-Koeffizient nach Spearman verwendet. Ferner wurde die Zusammenhangsstruktur einzelner Datensätze mithilfe von Faktorenanalysen (Hauptkomponentenmethode) eruiert. Dies diente u.a. dazu, für einzelne Faktoren (zusammenhängende Variablen) repräsentative Vertreter zu finden. Durch ein spezielles mathematisches Verfahren (Rotation der Ladungsmatrix, Varimax) wurde angestrebt, dass nach Möglichkeit jede Variable auf einen Faktor hoch lädt und auf alle anderen Faktoren niedrig. Das Signifikanzniveau wurde durchwegs bei  $p=0,05$  angenommen.

Für die Erfassung der Daten wurden Excel-Tabellen verwendet. Diese wurden mehrmals korrekturgelesen, unter anderem in Zusammenarbeit mit der Qualitätskontrolle der COSYCONET-Datenbank. Für die statistische Auswertung wurde das Statistikprogramm SPSS (IBM SPSS Statistics for Windows, Version 25, Armonk, USA) verwendet.



## 4 Ergebnisse

Bei der vorliegenden Studie handelt es sich um eine Querschnittsstudie, deren Daten einer longitudinalen Studie entstammen. Pro Patient wurden die Daten einer Visite analysiert (Visite 4 oder 5 von COSYCONET). Insgesamt wurden 46 Patienten in die Studie eingeschlossen. Die Daten umfassten Anamnese, Fragebogenergebnisse, Lungenfunktion, Blutproben, Hautabdrücke, Fotos und Funktionstests.

### 4.1 Basischarakteristika der Kohorte

#### 4.1.1 Anthropometrische Daten

Von den 46 Patienten waren 24 (52,2%) Frauen und 22 (47,8%) Männer. Die Kohorte wies ein mittleres ( $\pm$ SD) Alter von  $69 \pm 8$  Jahren auf und einen mittleren BMI von  $27,2 \pm 3,8$  kg/m<sup>2</sup>. Es befanden sich 8 (17,4%) Patienten im COPD-Grad GOLD 1, 20 (43,5%) in GOLD 2, 16 (34,8%) in GOLD 3 und 2 (4,3%) in GOLD 4. In der GOLD-Gruppe GOLD A befanden sich 25 (54,4%) Patienten, in GOLD B 10 (21,7%) Patienten, in GOLD C 5 (10,9%) Patienten, sowie 6 (13,0%) Patienten in der Gruppe GOLD D. Die grundlegenden Charakteristika sind in Tabelle 4.1 zusammengefasst.

Alter Jahre	Größe m	Gewicht kg	BMI kg/m <sup>2</sup>
69 $\pm$ 8	1,68 $\pm$ 0,11	76,9 $\pm$ 14,6	27,2 $\pm$ 3,8

FEV <sub>1</sub> %Soll	FVC %Soll	Tiffeneau	TLCO %Soll
59,1 $\pm$ 22,8	80,7 $\pm$ 17,8	0,55 $\pm$ 0,13	70,5 $\pm$ 22,5

KCO %Soll	Packyears	Gehstrecke m	CAT
72,5 $\pm$ 20,2	44,6 $\pm$ 34,8	448,8 $\pm$ 84,0	17,1 $\pm$ 6,9

mMRC	RV %Soll	RV/TLC %	ITGV %Soll
0,59 $\pm$ 0,58	166,9 $\pm$ 50,7	54,9 $\pm$ 10,8	140,8 $\pm$ 41,6

Tabelle 4.1: Mittelwerte und Standardabweichungen der Basisparameter der Patienten. Um eine Tabelle mit nur zwei Spalten zu vermeiden, wurden die Parameter zeilenweise angeordnet

Im Allgemeinen waren, wie bei einem Spektrum von Patienten mit COPD verschiedener Schweregrade zu erwarten, die Messgrößen mehr oder weniger stark miteinander korreliert. Die Beziehungen ausgewählter Lungenfunktionsparameter sind in Abbildung 4.1 veranschaulicht, die zugehörigen Korrelationskoeffizienten nach Spearman und ihre Signifikanzniveaus in Tabelle 4.2.

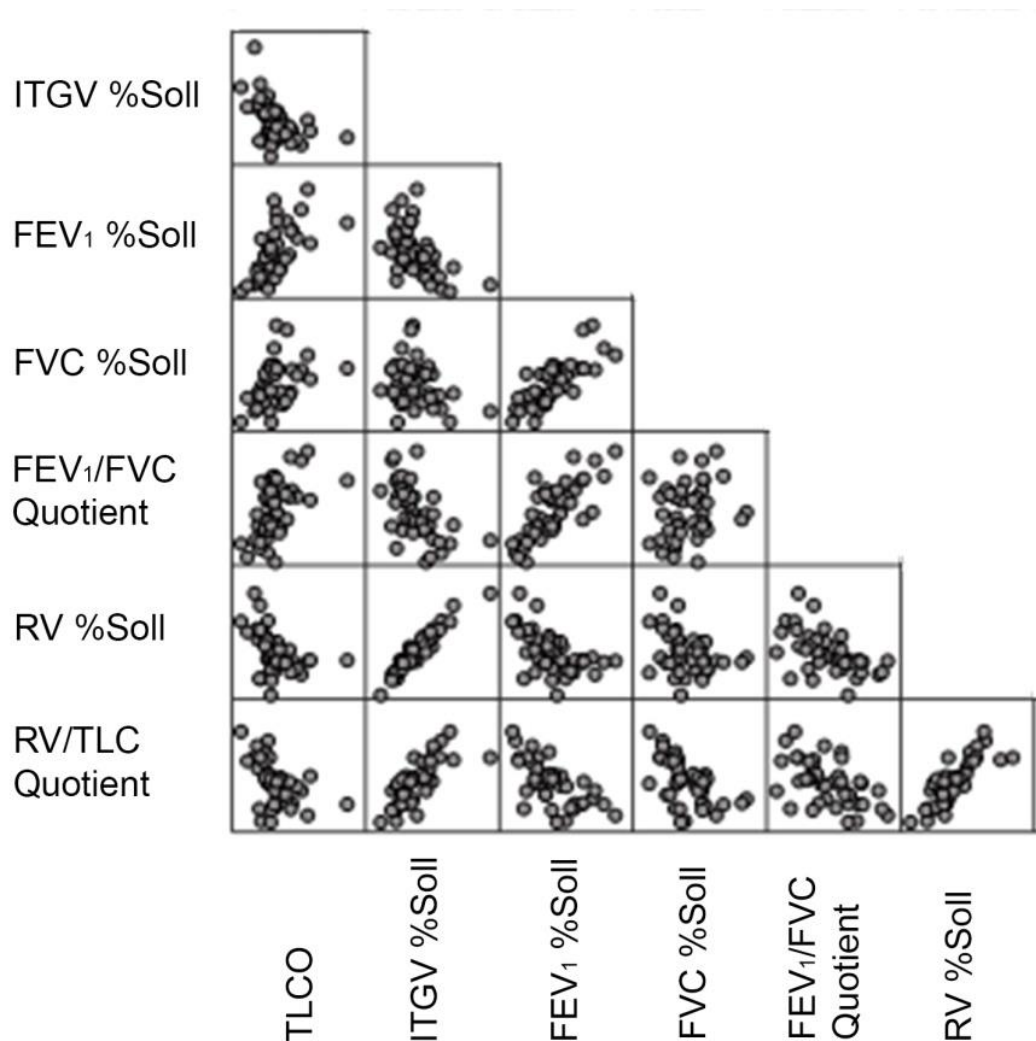


Abb. 4.1: Korrelationen verschiedener Lungenfunktionsparameter in Form eines multiplen Streudiagramms. Die Dimensionen der Parameter sind wie in Tab. 4.2. Die entsprechenden Korrelationskoeffizienten sind in Tabelle 4.2 zu finden

ITGV %Soll	0,457 (p=0,001)					
RV %Soll	0,426 (p=0,004)	0,956 (p=<0,001)				
RV/TLC Quotient	0,49 (p=0,001)	0,751 (p=<0,001)	0,818 (p=<0,001)			
FEV <sub>1</sub> %Soll	0,631 (p=<0,001)	0,525 (p=<0,001)	0,529 (p=<0,001)	0,663 (p=0<,001)		
FVC %Soll	0,406 (p=0,006)	0,318 (p=0,033)	0,347 (p=0,019)	0,426 (p=0,004)	0,737 (p=<0,001)	
FEV1/FVC Quotient	0,564 (p=<0,001)	0,572 (p=<0,001)	0,547 (p=<0,001)	0,426 (p=0,004)	0,761 (p=<0,001)	0,146 (p=0,333)
	TLCO %Soll	ITGV %Soll	RV %Soll	RV/TLC Quotient	FEV <sub>1</sub> %Soll	FVC %Soll

Tabelle 4.2: Korrelationskoeffizienten der Lungenfunktionsparameter (n=46) gemäß Spearman sowie zugehörige zweiseitige Signifikanzniveaus (in Klammern)

#### 4.1.2 Lungenfunktionsdaten und Emphysemscore

Die Tatsache der Korrelation zwischen den Lungenfunktionsparametern bedeutete naturgemäß nicht notwendigerweise, dass alle Lungenfunktionsparameter zu den Kenngrößen der Hautbeschaffenheit in gleicher Beziehung stehen mussten. Daher wurden die Lungenfunktionsgrößen einzeln ausgewertet. Diejenige Messgröße, die aufgrund der pathophysiologischen Vorinformationen am ehesten mit einem Emphysem als vermutetem Marker einer vorzeitigen biologischen Alterung korrelieren sollte, stellte die Diffusionskapazität TLCO dar. Der Korrelationskoeffizient von TLCO mit KCO (=TLCO/VA) betrug 0,879 nach Spearman und 0,924 nach Pearson (linearer Korrelationskoeffizient). Da das alveoläre Volumen VA, das mittels der Verdünnung eines eingeatmeten Gases messbar ist, vom Vorliegen eines Emphysems beeinflusst wird, ist nicht von vornherein zu entscheiden, welcher der beiden Parameter vorzuziehen ist. Daher wurden bezüglich eines Zusammenhanges mit den Hautparametern beide ausgewertet.

In einer publizierten Arbeit [Kahnert et al., 2018], die auf COSYCONET-Daten basierte, wurde anhand von CT-Thorax-Aufnahmen, die bei einem Teil der Patienten vorlagen, ein numerischer Score berechnet, der auf der Lungenfunktion basierte und das Vorhandensein eines Emphysems mit einem positiv-prädiktivem Wert in der Größenordnung von 75% angeben konnte. Für die vorliegende Arbeit wurde die Scorefunktio-

on geringfügig modifiziert, da andere Sollwerte als in der publizierten Arbeit verwendet wurden (siehe 3.6). Wendete man diese Scorefunktion auf die Daten der vorliegenden Untersuchung an, ergaben sich für TLCO und KCO sowie RV/TLC, FEV<sub>1</sub> und FVC die in Tabelle 4.3 angegebenen Unterschiede zwischen den Gruppen, denen ein Emphysem zugeschrieben wurde (n=14) oder nicht (n=30). Im Falle von FVC waren die Unterschiede nicht statistisch signifikant, allerdings ging FVC auch nicht in die Scorefunktion ein.

Ferner war bei insgesamt 14 Patienten ein CT vorhanden, das direkt auf das Vorhandensein eines Emphysems ausgewertet werden konnte [Kahnert et al., 2018]. Ein Emphysem war bei 5 Patienten zu diagnostizieren. Wegen der geringen statistischen Teststärke (Power) in dieser Untergruppe wurde auf entsprechende Vergleiche der Lungenfunktionsparameter verzichtet.

	Emphysem aus Funktion	Mittelwert	Std.-Abweichung	p-Wert
TLCO %Soll	nein	78,1	22,5	0,001
	ja	53,74	12,22	
KCO %Soll	nein	80,72	19,24	0,001
	ja	54,41	6,47	
FVC %Soll	nein	82,61	16,13	0,208
	ja	75,29	20,7	
FEV <sub>1</sub> %Soll	nein	65,45	17,37	0,001
	ja	43,23	17,13	
RV/TLC Quotient	nein	51,19	8,77	0,004
	ja	62,12	11,09	

Tabelle 4.3: Vergleich der Mittelwerte ausgewählter Lungenfunktionsparameter zwischen den beiden Gruppen, denen anhand einer berechneten Scorefunktion ein Emphysem zugeschrieben wurde oder nicht. Die Gruppenvergleiche basieren auf dem unpaarigen t-Test. Die Gruppengrößen betrugen n=14 (Emphysem) und n=30 (kein Emphysem)

## 4.2 Phänotypische Hautalterung

### 4.2.1 Beschreibung der Hautanalyse

Bei 44 Patienten konnten Hautabdrücke sowohl vom Augenaußenwinkel (zur Bestimmung des Einflusses des endo- und exogenen Alterungsprozesses) als auch von der Innenseite des Arms (zur Bestimmung des Einflusses der endogenen Alterung) genommen werden. Bei den Abdrücken am Auge wurde eine Faltenanalyse

durchgeführt, bei den Abdrücken am Arm wurden Rauheitsparameter bestimmt. Diese Unterscheidung war notwendig, da die Falten am Arm zu flach bzw. diffus waren, um von dem Auswertealgorithmus erkannt zu werden. Umgekehrt waren die Falten am Auge zu tief, um eine verlässliche Bestimmung der Rauheitsparameter zu erlauben. Die so ausgewählten Parameter konnten jeweils valide bestimmt werden. Bei einem Vergleich der Ergebnisse zwischen Auge und Arm sowie mit den Fotos sollte man somit berücksichtigen, dass verschiedene Sätze von Parametern herangezogen wurden.

Die statistischen Kenngrößen der Hautabdruckparameter für das Auge sind in Tabelle 4.4 dargestellt, diejenigen für den Arm in Tabelle 4.5 (siehe auch Anhang Tabelle 7.1). Im Folgenden werden die wichtigsten Parameter für die vorliegende Arbeit beschrieben.  $S_a$  beschreibt den Arithmetischen Rauhwert und ist der arithmetische Mittelwert der Beträge der Profilwerte des Rauheitsprofils.  $S_q$  ist der Quadratische Mittelwert der Profilwerte des Rauheitsprofils.  $S_{max}$  stellt die maximale Ausdehnung des Rauheitsprofils dar, also die Höhendifferenz von der höchsten Spitze zum tiefsten Tal innerhalb der Gesamtmessfläche.  $S_z$  bezeichnet die Zehnpunktehöhe und ist der Mittelwert der Beträge der 5 höchsten Spitzen und der 5 tiefsten Täler von der Gesamtmessfläche.  $S_t$  ist die Größte Rauhtiefe, also der größte Höhenunterschied innerhalb einer Einzelmessfläche.  $S_p$  beschreibt die Höhe der größten Profilspitze innerhalb der Gesamtmessfläche,  $S_v$  als Gegenstück die Tiefe des größten Profiltals innerhalb der Gesamtmessfläche.  $S_{sk}$  stellt als Schiefe ein Maß für die Asymmetrie der Amplitudendichtekurve dar. Alle genannten Parameter sind Senkrechtkenngößen und beschreiben somit die Rauheit in senkrechter Richtung.  $S_{la}$  ist eine abgeleitete Größe des arithmetischen Mittelwerts der örtlichen Profilsteigung in x- und y-Richtung (siehe Anhang Tabelle 7.1).  $PC$  gibt als Spitzenanzahl die Anzahl der Spitzen in der Gesamtmessstrecke,  $S$  den mittleren Abstand der Profilspitzen im Rauheitsprofil an. Letztere ist eine Waagrechtkenngöße.  $S_k$  beschreibt die Tiefe des Rauheitskerns.

Die Parameter der Hautabdrücke wurden mit dem Alter der Patienten in Beziehung gesetzt, und es zeigten sich teils starke Korrelationen der Parameter des Innenarms. Die Abdrücke des Augenaußenwinkels waren, wie zu erwarten, nur vereinzelt mit dem Alter korreliert; hier spielte der massive Einfluss der großen Falten für die Feinstruktur eine Rolle.

Aufgrund der Auswertelgorithmen sind bei den Parametern des Auges teils starke Korrelationen untereinander anzunehmen, wie aus Abbildung 4.2 zu entnehmen ist. In analoger Weise waren die Alterungsparameter des Armes miteinander korreliert (Abbildung 4.3). Die Beziehung zwischen ausgewählten Parametern des Auges und des Armes ist in Abbildung 4.4 dargestellt. Man erkennt, dass keine signifikanten Korrelationen auftraten und somit die Indikatoren der Hautalterung an Arm und Auge weitgehend unabhängig waren. Dies ist auch Tabelle 4.6 zu entnehmen, in der die entsprechenden Korrelationskoeffizienten mit den Signifikanzniveaus dargestellt sind.

	Mittlere Tiefe $\mu\text{m}$	Tiefste Falte $\mu\text{m}$	Anzahl Falten	Falten-Volumen $\text{mm}^2$	Falten-Fläche $\text{mm}^2$	Mittlerer Falten-Formfaktor	Falten-Länge $\text{mm}$	Mittl. Tiefe größte Falte $\mu\text{m}$	Max. Tiefe größte Falte $\mu\text{m}$
MIN	23,5	27	4	0,29	12,4	1,1	23	24	69
MAX	115,9	201	89	4,91	50,9	2,1	111	158	931
MW	51	84	31	1,99	37	1,6	67	64	276
SD	20,6	39	18	1,09	8,9	0,2	19	30	179
Median	48,5	79	26	1,76	38,4	1,6	67	59	227

**Tabelle 4.4:** Statistische Kenngrößen der Parameter des Augenaußenwinkels, die aus den Hautabdrücken bestimmt werden konnten. Aus Platzgründen wurden die Parameter horizontal angeordnet

	Sa	Sq	Smax	Sz	St	Sp	Sv	Ssk	Sku
MIN	8,8	11,5	129,5	126,2	129,5	49,4	-297,1	-1,03	3,05
MAX	31,5	42,2	440,9	428,1	440,9	184,7	-80,1	0,01	5,71
MW	17,5	22,6	226,6	216,5	226,6	90,6	-136	-0,6	4
SD	6,3	8	75,61	72,93	75,61	32,14	46,74	0,24	0,61
Median	15,8	20,4	206,1	191,2	206,1	77,9	-128,2	-0,61	3,93

	S	Sda	Sdq	Sla	Slq	PC	Sdr	Sk	Spk	Svk
MIN	251,3	0,1144	0,2142	0,4685	0,3274	128	2,239	28,2	9,9	15,5
MAX	763,5	0,224	0,4702	1,0388	0,6131	1291	9,717	99,5	37,1	68,7
MW	534,2	0,1566	0,3102	0,6848	0,4483	283	4,659	56,1	17,7	30,5
SD	102,76	0,03	0,07	0,13	0,07	175,59	1,97	20,14	7,26	10,48
Median	520,7	0,1508	0,2918	0,6593	0,439	258	4,049	50,6	14,9	28,9

**Tabelle 4.5:** Statistische Kenngrößen der Parameter des Innenarms, die aus den Hautabdrücken bestimmt werden konnten. Die Bedeutung der Abkürzungen ist Tab 7.1 im Anhang zu entnehmen. Aus Platzgründen wurden die Parameter horizontal angeordnet

Tiefe der Falten

Anzahl der Falten

Faltenvolumen

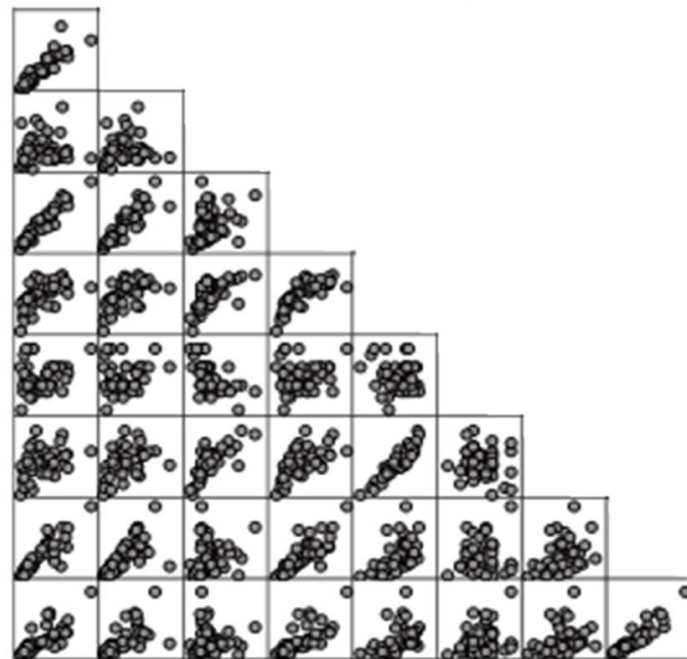
Faltenfläche

Mittlerer Falten-Formfaktor

Faltenlänge

Mittlere Tiefe größte Falte

Maximale Tiefe größte Falte



Mittlere Tiefe der Falten

Tiefe der Falten

Anzahl der Falten

Faltenvolumen

Faltenfläche

Mittlerer Falten-Formfaktor

Faltenlänge

Mittlere Tiefe größte Falte

Abbildung 4.2: Multiple Streudiagramme der Hautabdruckparameter des Augenaußenwinkels, welche die Korrelationen zwischen den verschiedenen Parametern verdeutlichen. Aus diesem Grunde wurde auf die Angabe numerischer Korrelationskoeffizienten und p-Werte verzichtet. Die Korrelationsstruktur wurde in den Faktorenanalysen näher ausgewertet

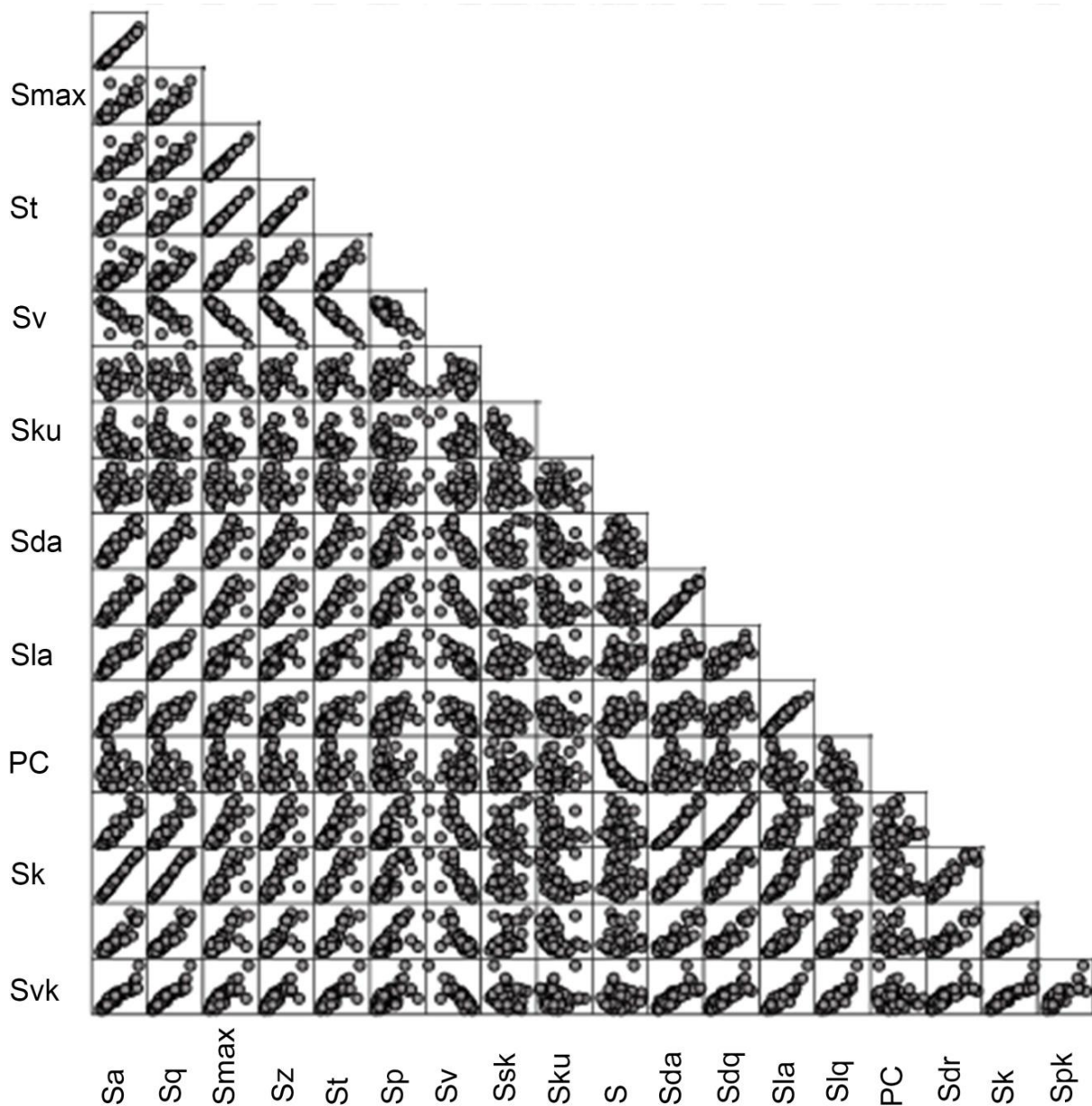


Abbildung 4.3: Multiple Streudiagramme der Hautabdruckparameter des Innenarms, welche die Korrelationen zwischen den verschiedenen Parametern verdeutlichen. Die Bedeutung der Abkürzungen ist Tab 7.1 im Anhang zu entnehmen. Aus diesem Grunde wurde auf die Angabe numerischer Korrelationskoeffizienten und p-Werte verzichtet. Die Korrelationsstruktur wurde in den Faktorenanalysen näher ausgewertet



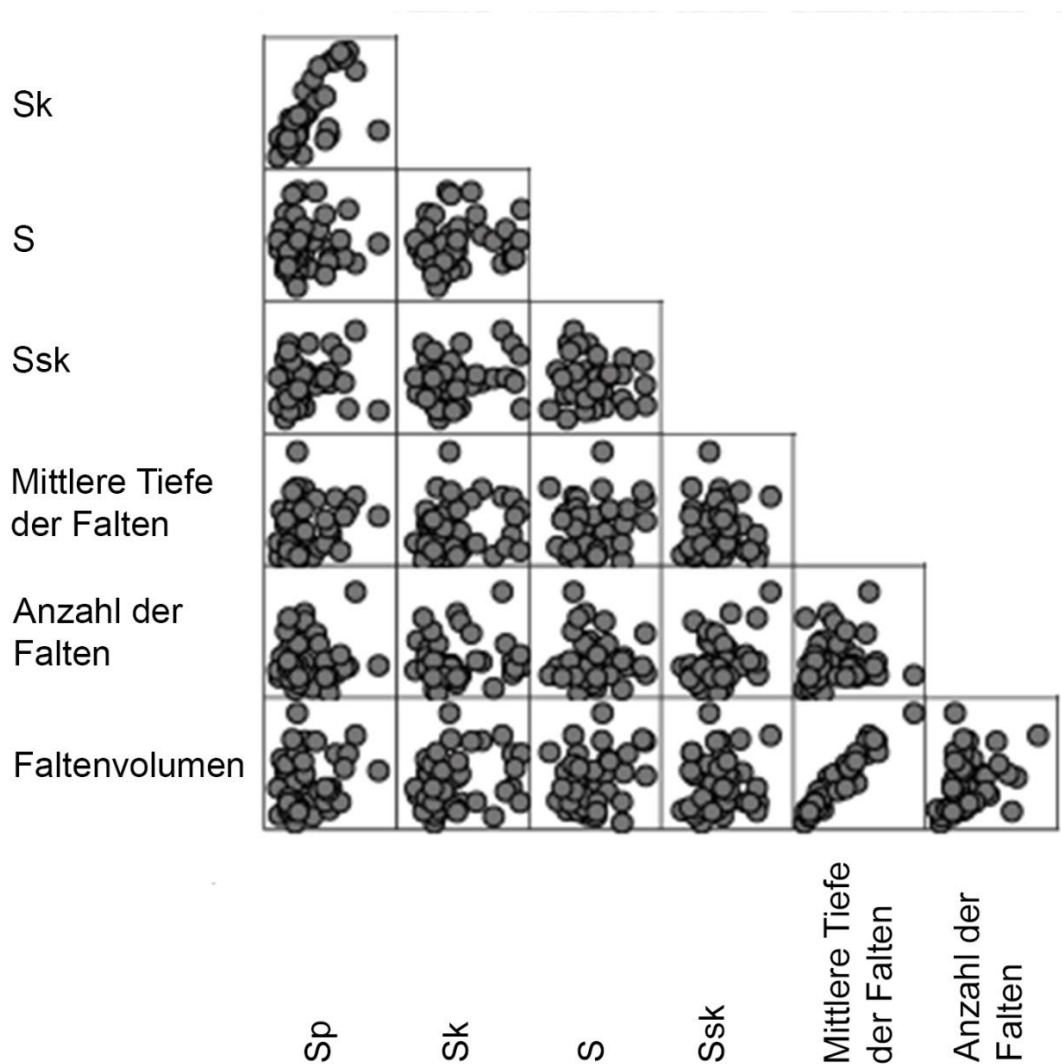


Abbildung 4.4: Streudiagramme ausgewählter Hautabdruckparameter des Innenarms sowie des Auges, welche die Korrelationen zwischen den Parametern verdeutlichen. Die Bedeutung der Abkürzungen für die Parameter des Innenarms ist Tab 7.1 im Anhang zu entnehmen. Die entsprechenden Korrelationskoeffizienten sind in Tabelle 4.6 zu finden

Die teilweise hohe Korrelation innerhalb der Hautparameter jeweils für Arm und für Auge warf die Frage auf, welche dieser Parameter für eine Analyse des Zusammenhangs mit anderen Daten optimal geeignet waren. Angesichts einer Fallzahl von  $n=44$  erschien es unrealistisch, sich alleine auf multiple Regressionsanalysen hoch miteinander korrelierter Variablen zu verlassen. Um möglicherweise die Dimension (Anzahl relevanter Variablen) des Datensatzes zu reduzieren, erfolgten als erster Schritt explorative Faktorenanalysen; hiermit konnte die Anzahl statistischer Freiheitsgrade innerhalb der jeweiligen Variablensätze bestimmt werden.

Sk	0,729					
	(p=<0,001)					
S	0,004	0,148				
	(p=0,980)	(p=0,336)				
Ssk	0,097	0,097	0,012			
	(p=0,530)	(p=0,530)	(p=0,940)			
Mittlere Tiefe der Falten	0,212	0,176	0,116	0,009		
	(p=0,172)	(p=0,260)	(p=0,460)	(p=0,953)		
Anzahl der Falten	0,028	0,002	0,098	0,321	0,158	
	(p=0,859)	(p=0,989)	(p=0,532)	(p=0,036)	(p=0,311)	
Faltenvolumen	0,191	0,208	0,202	0,046	0,953	0,357
	(p=0,221)	(p=0,181)	(p=0,194)	(p=0,770)	(p=<0,001)	(p=0,019)
	Sp	Sk	S	Ssk	Mittlere Tiefe der Falten	Anzahl der Falten

Tabelle 4.6: Korrelationskoeffizienten ausgewählter Hautparameter des Innenarms sowie des Auges (n=44) gemäß Spearman sowie zugehörige zweiseitige Signifikanzniveaus (in Klammern). Siehe auch Abb. 4.4. Die Bedeutung der Abkürzungen für die Parameter des Innenarms ist Tab. 7.1 im Anhang zu entnehmen

Hierbei zeigte sich, dass für das Auge zwei Faktoren (Dimensionen) identifiziert werden konnten, deren Eigenwerte 5,207 und 2,220 betrugen, die 82,5% der Varianz erklärten. Die rotierte (Varimax) Komponentenmatrix ist in Tabelle 4.7 dargestellt. Die angegebenen Werte (Ladungen) geben die Korrelationskoeffizienten der beobachteten Parameter mit den beiden identifizierten Faktoren an. Die mittlere Tiefe der Falten, die tiefste Falte, das Faltenvolumen, die mittlere Tiefe der größten Falte und die maximale Tiefe der größten Falte gehörten zu dem ersten Faktor, die Anzahl der Falten, die Faltenfläche, der Mittlere Falten-Formfaktor und die Faltenlänge zu dem zweiten Faktor. Im Allgemeinen war diese Zuordnung eindeutig, da die meisten Ladungen entweder über 0,7 lagen oder unter 0,3.

	Komponente	
	1	2
Mittlere Tiefe der Falten	<b>0,962</b>	0,06
Tiefste Falte	<b>0,868</b>	0,111
Anzahl der Falten	0,039	<b>0,947</b>
Faltenvolumen	<b>0,930</b>	0,293
Faltenfläche	0,610	<b>0,716</b>
Mittlerer Falten Formfaktor	0,354	-0,657
Faltenlänge	0,445	<b>0,802</b>
Mittlere Tiefe größte Falte	<b>0,902</b>	0,081
Maximale Tiefe größte Falte	<b>0,875</b>	-0,111

Tabelle 4.7: Matrix mit den Ladungen der Parameter des Auges relativ zu den beiden in der Faktorenanalyse identifizierten Komponenten. Die Ladungen entsprechen Korrelationskoeffizienten der beobachteten Variablen mit der hypothetischen zugrundeliegenden Komponente. Ladungen mit einem Betrag über 0,7 sind fett hervorgehoben

In analoger Weise wurden die Parameter der Hautanalyse für den Arm mittels Faktorenanalyse ausgewertet. Hierbei wurden Parameter, die in mathematisch eindeutiger Weise mit anderen zusammenhingen, ausgeschlossen, um Probleme bei der statistischen Schätzung zu vermeiden. Es fanden sich 3 Faktoren mit den Eigenwerten 6,956, 1,759 und 1,185, die zusammen 90,0% der Varianz erklärten. Die zugehörige rotierte Komponentenmatrix ist in Tabelle 4.8 dargestellt. Es ist zu erkennen, dass die Variable Ssk einen einzelnen Faktor repräsentiert, die Variablen S und PC einen weiteren Faktor, und die übrigen Variablen dem dominierenden ersten Faktor zuzurechnen sind.

	Komponente		
	1	2	3
Sa	<b>0,897</b>	0,154	0,321
Sq	<b>0,906</b>	0,153	0,292
Smax	<b>0,971</b>	0,003	-0,09
Sz	<b>0,975</b>	0,021	-0,081
Sp	<b>0,877</b>	-0,051	-0,064
Sv	<b>-0,966</b>	-0,040	0,102
Sk	<b>0,891</b>	0,156	0,337
S	0,057	<b>0,942</b>	-0,076
Ssk	0,042	-0,013	<b>0,900</b>
PC	-0,051	<b>-0,923</b>	-0,081
Sdr	<b>0,843</b>	0,013	0,441

Tabelle 4.8: Matrix mit den Ladungen der Parameter des Innenarms relativ zu den drei in der Faktorenanalyse identifizierten Komponenten. Die Ladungen entsprechen Korrelationskoeffizienten der beobachteten Variablen mit der hypothetischen zugrundeliegenden Komponente. Die Bedeutung der Abkürzungen ist Tab. 7.1 im Anhang zu entnehmen. Ladungen mit einem Betrag über 0,7 sind fett hervorgehoben

Die Ergebnisse dieser Analysen wiesen darauf hin, dass in den Parametern der Hautalterung verschiedenartige Informationen enthalten waren und daher von vornherein zu erwarten war, dass nur einzelne und nicht alle Parameter mit den Parametern der Lungenfunktion korrelierten. Welcher der Parameter aus den identifizierten Komponenten am besten mit der Lungenfunktion korrelierte, musste empirisch bestimmt werden.

## 4.2.2 Zusammenhang mit der Lungenfunktion

### *Orientierende Analysen*

Gemäß der Hauptfragestellung der Arbeit wurden die Hautparameter zu anderen Daten der Patienten, vor allem solchen der Lungenfunktion, in Beziehung gesetzt. Die Lungenfunktionsdaten dienten dazu, Surrogatmaße der biologischen Alterung der Lunge und insbesondere der Ausprägung eines Lungenemphysems zu liefern.

Die Parameter des Auges (siehe Tabelle 4.4) standen zu einem exemplarisch ausgewählten Satz von Lungenfunktionsparametern (RV/TLC, FEV<sub>1</sub> %Soll, TLCO %Soll) in keiner erkennbaren Beziehung, wie die Abbildungen 4.5 und 4.6 für die beiden Sätze von Hautparametern des Auges zeigt, die in Tabelle 4.7 den beiden Faktoren zugeordnet waren. Dies wurde durch eine Analyse der Korrelationskoeffizienten bestätigt, von denen keiner statistisch signifikant war.

Eine analoge Auswertung für die Parameter des Armes wies hingegen auf Korrelationen hin. Abbildung 4.7 zeigt exemplarisch die Korrelationen von RV/TLC, FEV<sub>1</sub> %Soll und TLCO %Soll mit denjenigen Parametern der Hautalterung, die in Tabelle 4.8 dem Faktor 1 zugeordnet waren. Abbildung 4.8 illustriert die Korrelation der drei Lungenfunktionsparameter mit den Hautparametern, die den Faktoren (Variablengruppen) 2 und 3 zugeordnet waren. Hierbei ist nicht nur die Korrelation der Hautparameter untereinander zu erkennen, sondern auch, dass in den Parametern, die Faktor 1 entsprachen (Abbildung 4.7), Korrelationen mit den Lungenfunktionsparametern angedeutet waren, hingegen in den Parametern, welche den Faktoren 2 und 3 entsprachen, keine solchen Korrelationen zu erkennen waren (Abbildung 4.8).

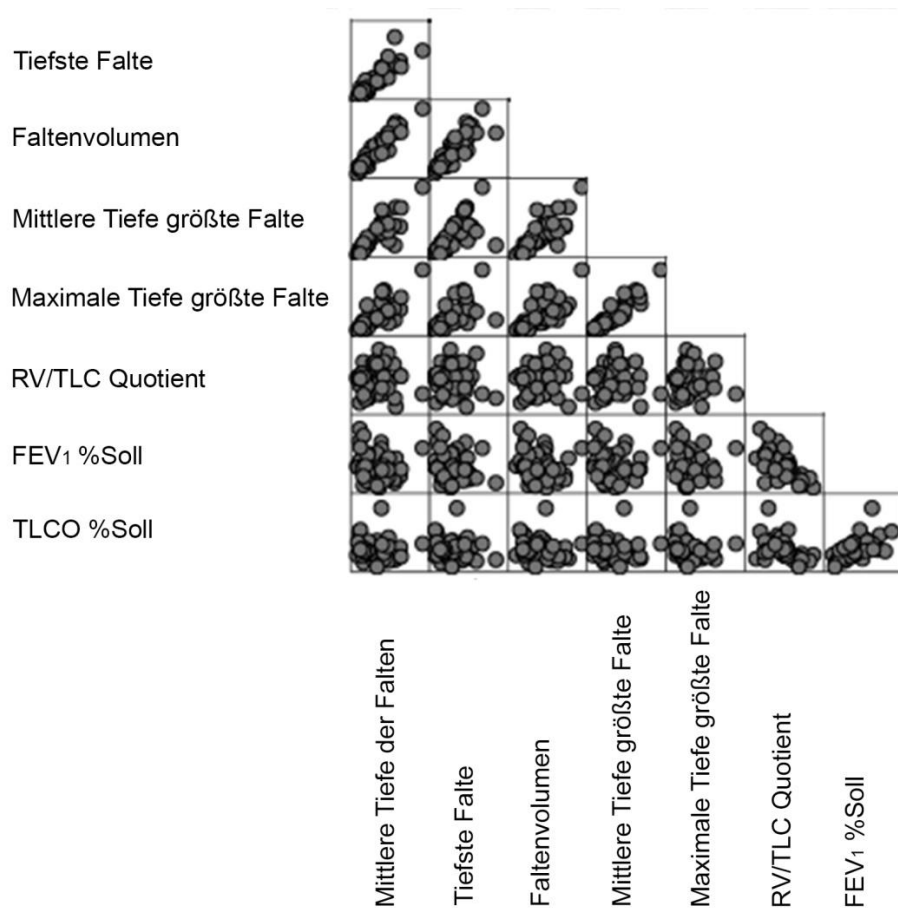


Abbildung 4.5: Streudiagramme der Beziehungen zwischen drei repräsentativen Lungenfunktionsparametern und denjenigen Parametern des Auges, die in der Faktorenanalyse dem Faktor 1 zugeordnet waren (siehe Tabelle 4.7)

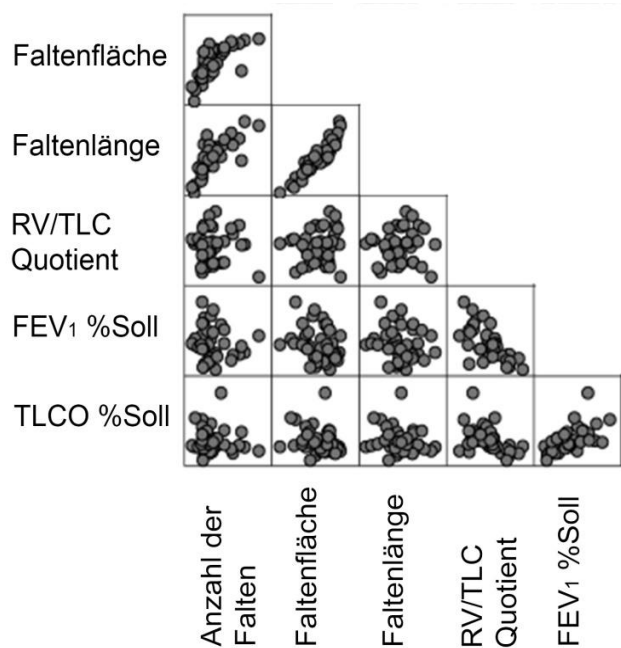


Abbildung 4.6: Streudiagramme der Beziehungen zwischen drei repräsentativen Lungenfunktionsparametern und den Parametern des Auges, die in der Faktorenanalyse dem Faktor 2 zugeordnet waren (siehe Tabelle 4.7)

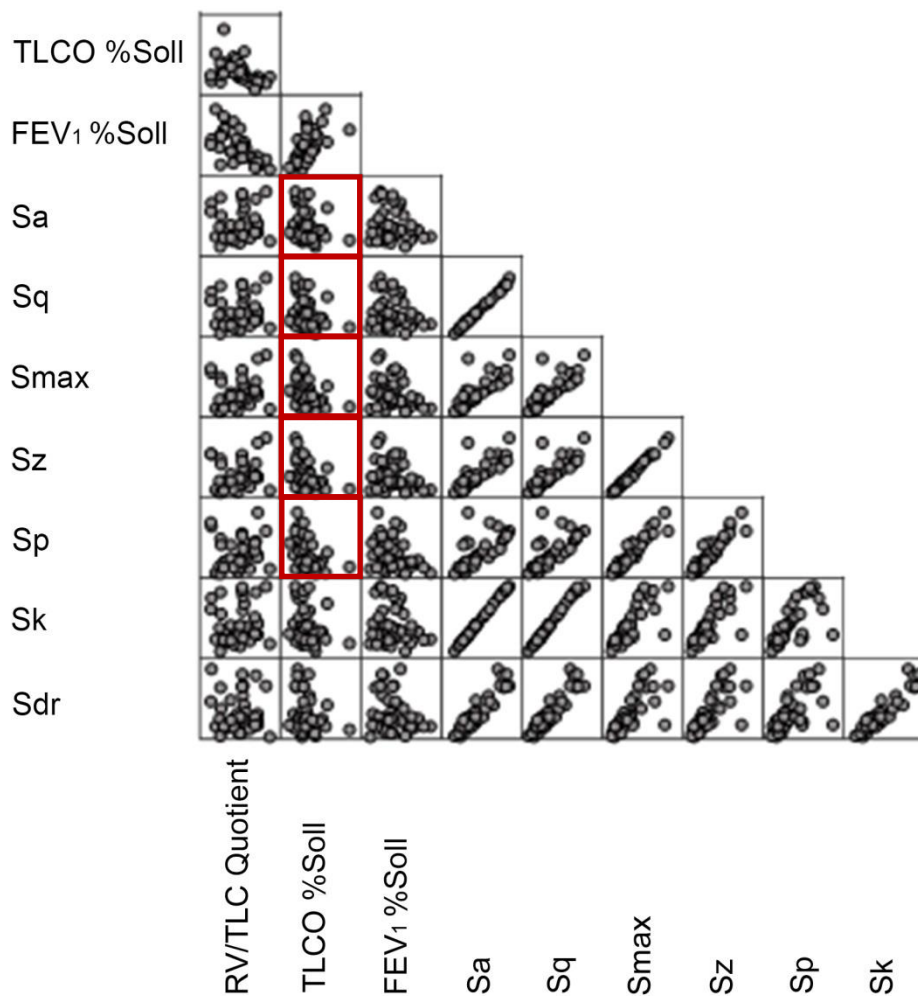
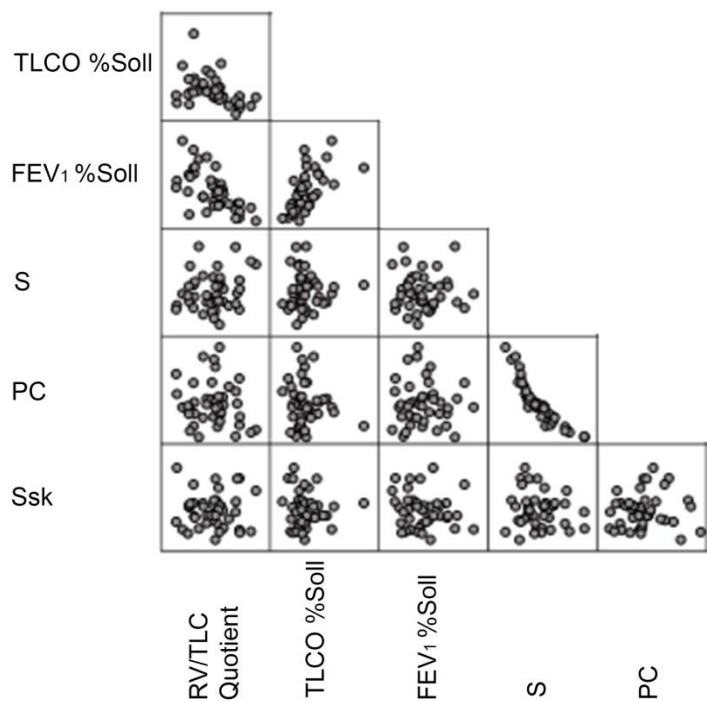


Abbildung 4.7: Streudiagramme der Beziehungen zwischen drei repräsentativen Lungenfunktionsparametern und denjenigen Parametern des Innenarms, die in der Faktorenanalyse dem Faktor 1 zugeordnet waren (siehe Tabelle 4.8). Die Bedeutung der Abkürzungen für die Parameter des Innenarms ist Tab. 7.1 im Anhang zu entnehmen. Die signifikanten Korrelationen von Interesse sind rot markiert



**Abbildung 4.8:** Streudiagramme der Beziehungen zwischen drei repräsentativen Lungenfunktionsparametern und denjenigen Parametern des Innenarms, die in der Faktorenanalyse den Faktoren 2 und 3 zugeordnet waren (siehe Tabelle 4.8). Die Bedeutung der Abkürzungen für die Parameter des Innenarms ist Tab. 7.1 im Anhang zu entnehmen

### *Regressionsanalysen*

Nach diesen orientierenden Analysen erfolgten lineare Regressionsanalysen, um die einzelnen Parameter, in denen sich eine Beziehung andeutete, statistisch zu untersuchen, und zwar für die Parameter des Arms, da für diejenigen des Auges keinerlei Beziehungen bestanden. Diese Analysen boten vor allem die Möglichkeit, Kovariate wie Alter und BMI als zusätzliche Einflussgrößen einzuführen, um zu untersuchen, ob die gefundenen Beziehungen gegenüber diesen Größen robust waren.

Zunächst zeigte sich in bivariaten, den einfachen Korrelationen entsprechenden Analysen, dass insbesondere zwischen dem Hautparameter  $S_p$  und der Diffusionskapazität  $TLCO \%Soll$  eine statistisch signifikante ( $p=0,012$ ) lineare Beziehung bestand, die in Abbildung 4.9 dargestellt ist; herein sind die Patienten mit  $BMI < 25 \text{ kg/m}^2$  besonders hervorgehoben, da die Hautbeschaffenheit vom BMI abhängen könnte (siehe unten). Das Signifikanzniveau der linearen Beziehungen zwischen  $TLCO \%Soll$  und  $S_{max}$  betrug  $p=0,014$ . Für  $S_z$  betrug es  $p=0,017$ , für  $S_t$   $p=0,014$ , für  $S_v$   $p=0,025$ , für  $S_{la}$   $p=0,047$ . Für den Transferkoeffizienten  $KCO \%Soll$



ergaben sich ähnliche Beziehungen, diese waren aber mit höheren p-Werten verbunden.

Bezüglich der anderen Parameter des Arms aus Tabelle 4.5 ergaben sich keine signifikanten Beziehungen zur Diffusionskapazität TLCO. Darüber hinaus bestanden keine signifikanten Zusammenhänge zu den anderen Lungenfunktionsgrößen, insbesondere denjenigen der Spirometrie und der Ganzkörperplethysmyographie, auch nicht zu RV/TLC oder FEV<sub>1</sub> %Soll als Markern von Überblähung und Obstruktion. Aus diesem Grunde wurden im Folgenden primär die Parameter Sp und TLCO %Soll weiter analysiert.

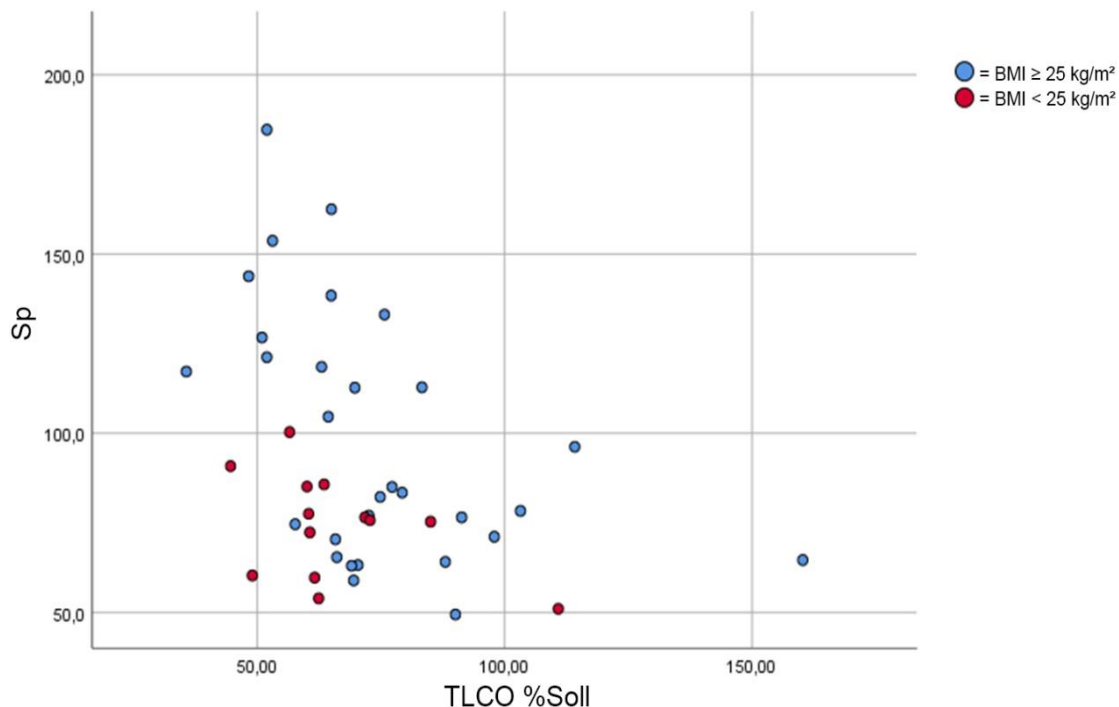


Abbildung 4.9: Beziehung zwischen der Diffusionskapazität TLCO in Prozent vom Soll und dem Parameter Sp der Hautbeschaffenheit des Innenarms. Zusätzlich sind Patienten mit einem BMI < 25 kg/m<sup>2</sup> rot markiert, da die Beziehung vom BMI abhängen könnte

#### *Berücksichtigung von anthropometrischen Einflussgrößen*

Da die Beschaffenheit der Haut mit dem BMI und dem Alter korreliert ist und sich dies auch in den gemessenen Parametern der Hautalterung bemerkbar machen könnte, stellte sich als nächstes die Frage, ob die Beziehung von Sp zu TLCO möglicherweise auf diese Störeinflüsse zurückging. Das ist für die Fragestellung dieser Arbeit deswegen relevant, weil ein geringer BMI mit einer höheren

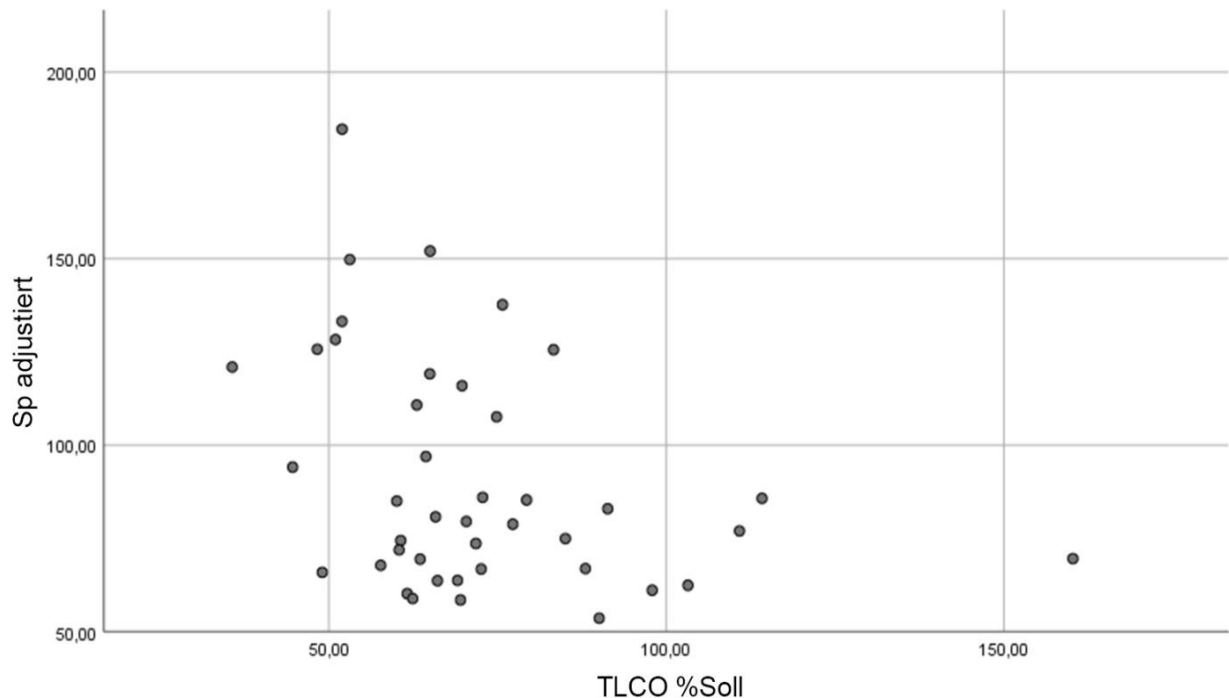
Wahrscheinlichkeit eines Lungenemphysems, entsprechend einer verringerten TLCO, und zugleich einer höheren Wahrscheinlichkeit für eine stärkere Rauheit der Haut einhergeht.

Um diese Frage zu klären, erfolgten lineare Regressionsanalysen mit Sp als abhängiger Variablen und den Werten von TLCO %Soll als Prädiktor sowie BMI, Alter, aktuellem Raucherstatus (ja/nein), Packyears und Geschlecht als zusätzlichen unabhängigen Variablen (Kovariaten). Hierbei fand sich für TLCO nach wie vor ein statistisch signifikanter Zusammenhang ( $p=0,015$ ). Der Zusammenhang mit den Kovariaten war nicht signifikant (Tabelle 4.9). Bei einer schrittweisen (vorwärts) Auswahl der Prädiktoren bestätigte sich das Ergebnis, dass ausschließlich für TLCO %Soll eine signifikante Beziehung bestand ( $p=0,013$ ).

Für die anderen fünf Hautparameter, die in den bivariaten Korrelationsanalysen Hinweise auf einen Zusammenhang mit TLCO zeigten, bestanden ebenfalls signifikante Zusammenhänge mit TLCO %Soll unter Berücksichtigung der oben genannten Kovariaten. Die Signifikanzniveaus betrugen für Smax  $p=0,011$ , für Sz  $p=0,013$ , für St  $p=0,011$ , für Sv  $p=0,015$  und für Sla  $p=0,039$  (zur Bedeutung der Abkürzungen siehe Tabelle 7.1 im Anhang). Daher waren alle Beziehungen zwischen den Hautparametern des Innenarms und TLCO %Soll robust gegenüber potentiell relevanten anderen Einflussgrößen. Abbildung 4.10 zeigt die Beziehung zwischen TLCO %Soll und den Werten von Sp, die ungeachtet der nicht signifikanten Beziehungen zu den Kovariaten für BMI, Alter, Raucherstatus, Packyears und Geschlecht adjustiert wurden. Die Adjustierung beeinflusste die Stärke der Beziehung nicht erkennbar im Vergleich zu den unadjustierten Werten (Abbildung 4.9).

	Nicht standardisierte Koeffizienten		Standardisierte Koeffizienten	t	p
	Regressionskoeffizient B	Std.-Fehler	Beta		
(Konstante)	29,02	58,685		0,494	0,624
TLCO %Soll	-0,632	0,246	-0,427	-2,562	<b>0,015</b>
Alter (Jahre)	0,713	0,609	0,183	1,172	0,249
Geschlecht (m versus w)	6,124	10,469	0,095	0,585	0,562
BMI (kg/m <sup>2</sup> )	1,904	1,413	0,222	1,348	0,186
Raucher (ja versus nein)	2,353	12,491	0,03	0,188	0,852
Packyears	-0,087	0,149	-0,095	-0,586	0,561

**Tabelle 4.9:** Regressionskoeffizienten (standardisiert (Beta) und nicht standardisiert (B)) für die Beziehung zwischen sp (abhängige Variable) und den fünf angegebenen Prädiktoren in einer multiplen linearen Regressionsanalyse. Alleine TLCO war ein signifikanter Prädiktor (fett hervorgehoben). t ist der Wert der entsprechenden t-verteilten Bewertungsgröße und p der jeweilige Signifikanzlevel



**Abbildung 4.10:** Beziehung zwischen der Diffusionskapazität TLCO in Prozent vom Soll und den für BMI, Alter, aktuellen Raucherstatus (ja/nein), Packyears und Geschlecht adjustierten Werten des Parameters Sp der Hautbeschaffenheit des Innenarms. Das Diagramm war nicht wesentlich von demjenigen der unadjustierten Werte verschieden (siehe Abbildung 4.9)

Für KCO %Soll war die Beziehung zu Sp nicht mehr signifikant ( $p=0,061$ ), wenn man die fünf Kovariaten mitberücksichtigte; ohne die Kovariaten lag die Stärke der Beziehung an der Grenze der Signifikanz ( $p=0,051$ ). Die Werte der Regressionskoeffizienten und die Beziehung der adjustierten Werte von Sp zu KCO sind in Tabelle 4.10 und Abbildung 4.11 dargestellt.

In einem nächsten Schritt wurde der mögliche Effekt des Körpergewichtes näher analysiert, da das Körpergewicht nicht alleine mit der Beschaffenheit der Haut, sondern mit der Ausprägung einer COPD, insbesondere eines Lungenemphysems, verbunden sein kann. Obwohl insgesamt die Beziehung zwischen Sp und BMI nicht signifikant war, wurde zusätzlich geprüft, ob speziell das Vorliegen normaler oder niedriger Werte von BMI eine unterschiedliche Beziehung zur Hautalterung zeigte. Zu diesem Zweck war bereits in Abbildung 4.9 die Beziehung zwischen TLCO %Soll und Sp (unadjustiert) gezeigt worden, wobei die beiden Gruppen mit  $\text{BMI} < 25 \text{ kg/m}^2$  ( $n=13$ ) und  $\text{BMI} \geq 25 \text{ kg/m}^2$  ( $n=30$ ) markiert wurden.

	Nicht standardisierte Koeffizienten		Standardisierte Koeffizienten	t	p
	Regressionskoeffizient B	Std.-Fehler	Beta		
(Konstante)	30,653	61,986		0,495	0,624
KCO %Soll	-0,566	0,292	-0,343	-1,94	0,061
Alter (Jahre)	0,786	0,632	0,202	1,244	0,222
Geschlecht (m versus w)	4,344	10,821	0,067	0,401	0,691
BMI ( $\text{kg/m}^2$ )	1,668	1,479	0,195	1,128	0,267
Raucher (ja versus nein)	4,284	12,887	0,054	0,332	0,742
Packyears	-0,12	0,158	-0,131	-0,761	0,451

**Tabelle 4.10:** Regressionskoeffizienten (standardisiert (Beta) und nicht standardisiert (B)) für die Beziehung zwischen Sp (abhängige Variable) und den fünf angegebenen Prädiktoren in einer multiplen linearen Regressionsanalyse. t ist der Wert der entsprechenden t-verteilten Bewertungsgröße und p der jeweilige Signifikanzlevel

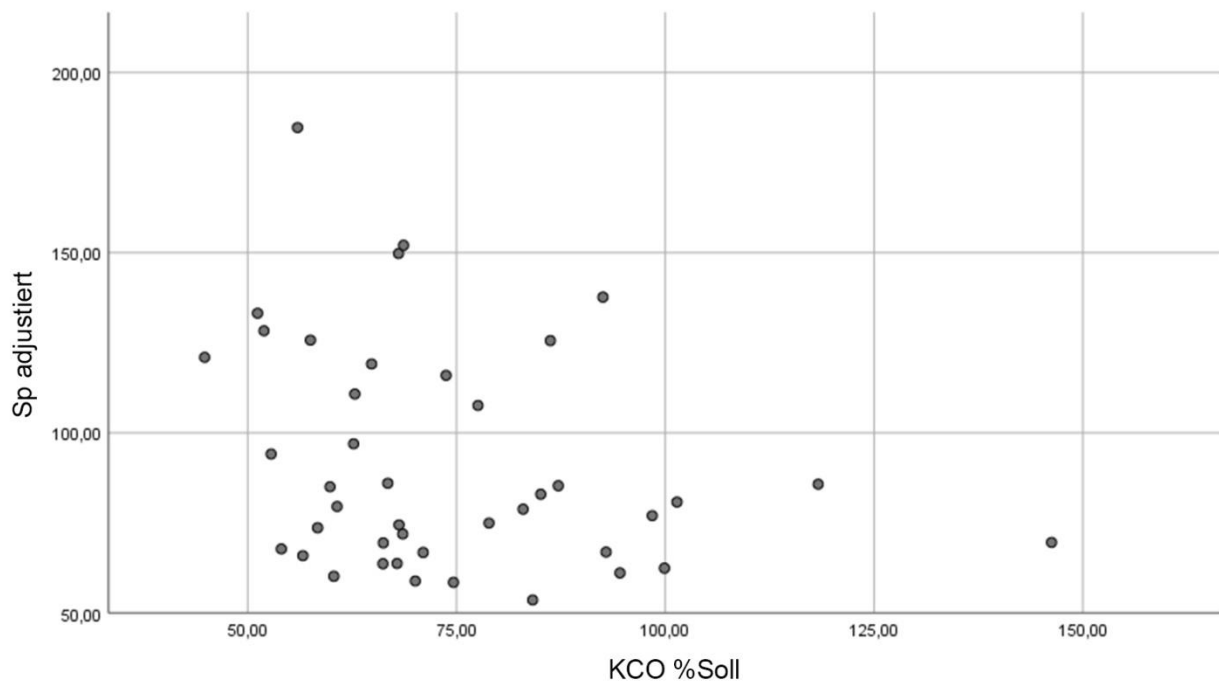


Abbildung 4.11: Beziehung zwischen dem Transferkoeffizienten KCO in Prozent vom Soll und den für BMI, Alter, aktuellen Raucherstatus (ja/nein), Packyears und Geschlecht adjustierten Werten des Parameters Sp der Hautbeschaffenheit des Innenarms.

Angedeutet ist zu sehen, dass im Falle eines größeren BMI die Beziehung zwischen Sp und TLCO %Soll stärker war, als im Falle eines niedrigen BMI. Entsprechend war bei niedrigem BMI die Beziehung nicht signifikant, während sie bei höherem BMI signifikant blieb ( $p=0,046$ ) und bei Ausschluss aller Kovariaten, zu denen ohne dies keine signifikante Beziehung bestand, sogar ein Signifikanzniveau von  $p=0,006$  erreichte. Diese Ergebnisse legen die Annahme nahe, dass bei niedrigem BMI der Einfluss des BMI auf die Hautbeschaffenheit den Zusammenhang der Hautbeschaffenheit mit der TLCO überdeckt.

Auf der Basis einer vorangegangenen Publikation [Kahnert et al., 2018; siehe 3.6 und 4.1.2] konnte aus vier verschiedenen Funktionsparametern ein kontinuierlicher Emphysemscore berechnet werden, der ein Maß für die Wahrscheinlichkeit bzw. Ausprägung eines Emphysems darstellte (siehe Kapitel 3.6 und entsprechende binäre Klassifikation in Tabelle 4.9). In dieser Formel spielt die Diffusionskapazität eine maßgebliche Rolle. Daher wurde geprüft, ob der Emphysemscore möglicherweise der TLCO überlegen war.

Wenn man unter Berücksichtigung der fünf Kovariaten den Emphysemscore als Prädiktor von Sp und von Smax ansetzte, waren die Beziehungen zu diesen beiden

Messgrößen nur angedeutet ( $p=0,174$  bzw.  $p=0,071$ ). Dies weist darauf hin, dass in Hinsicht auf die Hautbeschaffenheit die abgeleitete Größe „Emphysemscore“ weniger Information enthielt als die unmittelbare Messgröße TLCO %Soll.

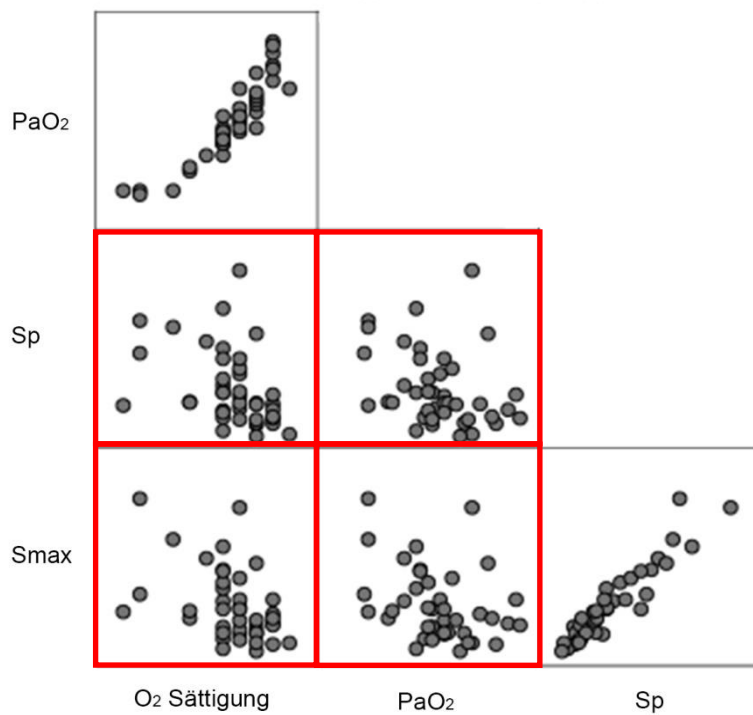
#### *Zusammenfassung der Regressionsanalysen*

Als Hauptergebnis war festzuhalten, dass neben anderen Parametern des Innenarms insbesondere die Beziehung zwischen Sp und TLCO %Soll bei allen Adjustierungen um potenziell relevante andere Einflussgrößen erhalten blieb und als statistisch robust anzusehen war. Für KCO %Soll galt das im Prinzip ebenfalls, wenngleich die Beziehungen nur an der Grenze zur Signifikanz lagen. Dies deutet darauf hin, dass der kombinierte Effekt von Transportstörung und Verringerung des für den Gastransport zugänglichen Volumens, wie er durch TLCO beschrieben wird, am besten das Ausmaß einer biologischen Alterung widerspiegelte, wie sie ebenfalls in der Hautbeschaffenheit des Innenarms zu Tage trat.

### **4.2.3 Zusammenhang mit anderen klinischen und funktionellen Größen**

#### *Säure-Basen-Haushalt und Blutgase*

Da eine COPD in der Regel auch mit Veränderungen der Blutgase und des Säure-Basen-Haushaltes einhergeht, wurde deren möglicher Zusammenhang mit den Parametern der Hautalterung untersucht. Hierzu dienten zum einem die Sättigung SaO<sub>2</sub>, der Partialdruck PaO<sub>2</sub>, der Partialdruck PaCO<sub>2</sub>, der pH-Wert und der Base-Excess BE, ferner der anhand von SaO<sub>2</sub>, PaO<sub>2</sub> und Hb errechnete Sauerstoffgehalt CaO<sub>2</sub>. Als Parameter der Hautbeschaffenheit des Innenarms wurden zum ersten Sp und Smax, sodann S und Ssk ausgewählt, da diese die drei identifizierten Komponenten (Dimensionen) gut repräsentierten (siehe Kapitel 4.2.1, Tabelle 4.8). Hierbei fanden sich signifikante, konsistente Korrelationen nur zwischen SaO<sub>2</sub> und PaO<sub>2</sub> einerseits und Sp und Smax andererseits. Diese sind in Abbildung 4.12 dargestellt und in Tabelle 4.11 numerisch angegeben. Für die Parameter des Auges ergaben sich keine signifikanten Zusammenhänge mit den Werten der Blutgase bzw. des Säure- Basenhaushaltes.



**Abbildung 4.12:** Beziehungen zwischen Sauerstoffsättigung des Blutes und Partialdruck für Kohlendioxid sowie Sp und Smax als repräsentativen Parametern der Hautbeschaffenheit des Innenarms. Die Beziehungen waren statistisch signifikant ( $p < 0.05$ ). Die numerischen Werte der Korrelation sind in Tabelle 4.11 angegeben. Die Abkürzungen für die Hautparameter sind in Tab. 7.1 im Anhang zu finden. Die signifikanten Korrelationen von Interesse sind rot markiert

PaO <sub>2</sub>	0,943		
	( $p < 0,001$ )		
sp	-0,491	-0,392	
	( $p = 0,001$ )	( $p = 0,011$ )	
smax	-0,445	-0,367	0,933
	( $p = 0,004$ )	( $p = 0,018$ )	( $p < 0,001$ )
	O <sub>2</sub> -Sättigung	PaO <sub>2</sub>	sp

**Tabelle 4.11:** Korrelationskoeffizienten gemäß Spearman sowie zugehörige zweiseitige Signifikanzniveaus (in Klammern) zwischen der Sauerstoffsättigung des Blutes und dem Partialdruck für Sauerstoff sowie Sp und Smax als repräsentativen Parametern der Hautbeschaffenheit des Innenarms. Die Beziehungen waren statistisch signifikant ( $p < 0,05$ , 2-seitig). Siehe auch Abbildung 4.12. Die Bedeutung der Abkürzungen für die Parameter des Innenarms ist Tab. 7.1 im Anhang zu entnehmen

Die Sättigung  $\text{SaO}_2$  war auch mit anderen Parametern der Hautbeschaffenheit des Arms signifikant korreliert. Dies bestätigte sich in einer Faktorenanalyse, in die alle Hautparameter sowie zusätzlich die Sättigung Eingang fanden. Hierbei ergaben sich zwei Faktoren, mit Eigenwerten von 11,998 und 1,193 und einer erklärten Gesamtvarianz von 87,9%, deren rotierte Komponentenmatrix in Tabelle 4.12 dargestellt ist. Sie bestätigte, dass auch unter Einbeziehung von  $\text{SaO}_2$  die Hautparameter des Arms in 2 Gruppen (Faktoren) zerlegt werden konnten, die zwar nicht sehr stark voneinander separiert waren, jedoch eine relativ klare Zuordnung von  $\text{SaO}_2$  zeigten. Ein ähnliches Bild ergab sich für  $\text{PaO}_2$ , der auch mit in der Tabelle angegebenen Messgrößen der Hautbeschaffenheit des Arms korrelierte. Für die Hautbeschaffenheit des Auges bestanden keine Korrelationen mit  $\text{SaO}_2$  oder  $\text{PaO}_2$ .

Da  $\text{SaO}_2$  und TLCO %Soll in der Regel miteinander gekoppelt sind, insofern als eine eingeschränkte TLCO mit einer geringeren  $\text{SaO}_2$  einhergeht, erfolgte eine lineare Regressionsanalyse mit Sp als abhängiger Variable und  $\text{SaO}_2$  und TLCO %Soll als Prädiktoren, unter Berücksichtigung der Kovariaten Alter, Geschlecht, Raucherstatus, Packyears sowie BMI. Hierbei fand sich eine nach wie vor signifikante ( $p=0,044$ ) Korrelation mit TLCO %Soll, die Beziehung zu  $\text{SaO}_2$  war jedoch nicht signifikant. Wenn man  $\text{SaO}_2$  ohne TLCO %Soll als Prädiktor führte, war die Beziehung ebenfalls nicht signifikant ( $p=0,095$ ), sie wurde nur signifikant, wenn sie unter Weglassung der Kovariaten als einziger Prädiktor geführt wurde. Diese Daten implizieren, dass  $\text{SaO}_2$  nur als nachgeordnete Variable im Vergleich zu TLCO von Bedeutung ist, was die Korrelation mit der Hautbeschaffenheit angeht. Daher wurde die Analyse der Blutgase nicht weiter verfolgt.



	Komponente	
	1	2
Sz	0,563	<b>0,808</b>
Sa	<b>0,922</b>	0,376
Sq	<b>0,915</b>	0,397
Sv	-0,589	<b>-0,766</b>
Sdq	<b>0,842</b>	0,402
Slq	<b>0,834</b>	0,279
Sdr	<b>0,842</b>	0,366
Sk	<b>0,925</b>	0,368
Spk	<b>0,829</b>	0,43
Svk	<b>0,807</b>	0,472
St	0,535	<b>0,831</b>
Sp	0,398	<b>0,847</b>
Sla	<b>0,853</b>	0,382
Smax	0,535	<b>0,831</b>
O <sub>2</sub> -Sättigung	-0,095	-0,604

**Tabelle 4.12:** Rotierte (Varimax) Ladungsmatrix einer Faktorenanalyse (Hauptkomponenten), in die alle Parameter des Innenarms sowie zusätzlich die Sauerstoffsättigung eingingen, um zu eruieren, mit welchem Faktor die Sauerstoffsättigung am ehesten zusammenhing. Dies war Faktor 2, in den auch Sp, Sz, St, Smax und Sv in hohem Maße eingingen. Faktorladungen mit einem Betrag über 0,7 sind fett markiert. Zu erkennen ist, dass die Sauerstoffsättigung am ehesten Faktor 2 zuzurechnen war. Die Abkürzungen für die Hautparameter sind in Tab. 7.1 im Anhang zu finden

## *Komorbiditäten*

### Parameter der Innenarms

Als nächstes wurde geprüft, ob für die COPD häufige und wichtige Komorbiditäten mit Unterschieden der Hautparameter einhergingen. Zu diesem Zweck wurden alle Parameter des Arms und folgende Komorbiditäten geprüft: Diabetes, Asthma, Hyperlipidämie, Hyperurikämie, gastrointestinale Störungen, Osteoporose, koronare Herzerkrankung, Bluthochdruck (alle in erweiterter Definition basierend auf Patientenreport und/oder krankheitsspezifischer Medikation [Lucke et al., 2016]), ferner Herzinsuffizienz, Herzinfarkt, Durchblutungsstörung des Herzens und Schlaf-

apnoe (basierend alleine auf Patientenangaben in Ermangelung hinreichend krankheitsspezifischer Medikation). Da die Gruppengrößen teilweise sehr unterschiedlich waren und die Gruppen deutlich unterschiedliche Streubreiten aufwiesen, erfolgten die statistischen Vergleiche mittels des nichtparametrischen Mann-Whitney-U-Testes. Insgesamt waren die Fallzahlen von Patienten mit Komorbiditäten gering (Diabetes  $n=1$ , Asthma  $n=8$ , Hyperlipidämie  $n=19$ , Hyperurikämie  $n=10$ , Gastrointestinale Störungen  $n=21$ , Osteoporose  $n=11$ , koronare Herzerkrankung  $n=5$ , Bluthochdruck  $n=21$ , Herzinsuffizienz  $n=1$ , Herzinfarkt  $n=3$ , Durchblutungsstörung des Herzens  $n=5$ , Schlafapnoe  $n=1$ ). Daher war die statistische Teststärke (Power) ebenfalls gering.

Es fanden sich keine signifikanten Beziehungen zwischen den Hautparametern des Arms und den genannten Komorbiditäten, mit Ausnahme einer Beziehung zwischen Ssk (siehe Tab. 7.1 im Anhang) und dem Vorhandensein einer Hyperlipidämie (HLP) ( $p=0,010$ ). Insgesamt wiesen 19 von 44 Patienten die Diagnose einer Hyperlipidämie auf. Die Verteilung der Werte von Ssk in Abhängigkeit von dieser Diagnose ist in Abbildung 4.13 dargestellt. Da eine Hyperlipidämie mit Basischarakteristika wie BMI und Geschlecht zusammenhängen kann, wurde geprüft, ob auch hierfür signifikante Zusammenhänge mit Ssk bestanden; dies war nicht der Fall. Dies warf die Frage auf, inwieweit der signifikante Unterschied bezüglich Ssk durch die multiplen statistischen Tests zustande kam. Hierbei war zu berücksichtigen, dass alle anderen Unterschiede weit von dem Niveau  $p=0,05$  entfernt waren.

Zur näheren Beleuchtung dieser Frage wurde in einer Kovarianzanalyse geprüft, ob die Werte von Ssk von HLP abhingen, wenn gleichzeitig BMI und Geschlecht berücksichtigt wurden. Hierbei ergab sich nach wie vor ein signifikanter ( $p=0,015$ ) Zusammenhang mit HLP, nicht jedoch mit BMI und Geschlecht. Eine weitere Adjustierung um das Alter veränderte die Signifikanz von HLP nicht ( $p=0,014$ ). Dieses statistisch robuste Ergebnis warf die Frage nach der konkreten Bedeutung von Ssk auf. Dieser Parameter beschreibt die Asymmetrie (Schiefe, skewness) in den Amplituden der Hautfalten-Verteilung (Tab. 7.1 im Anhang), also nicht ihre Anzahl oder ihr Ausmaß. Der Wert bei einer Normalverteilung der Faltenamplituden ist Null, und laut Auswertemanual (Handbuch, Optisches 3D-Hautmessgerät PRIMOSlite, Software PRIMOS 5.7; GFMesstechnik GmbH, heute LMI) bezeichnet ein stärker negativer Wert eine „Oberfläche mit gutem Tragverhalten“. Dies würde

bedeuten, dass in Gegenwart einer Hyperlipidämie das Tragverhalten der Haut geringer ist, zumindest bei Patienten mit COPD.

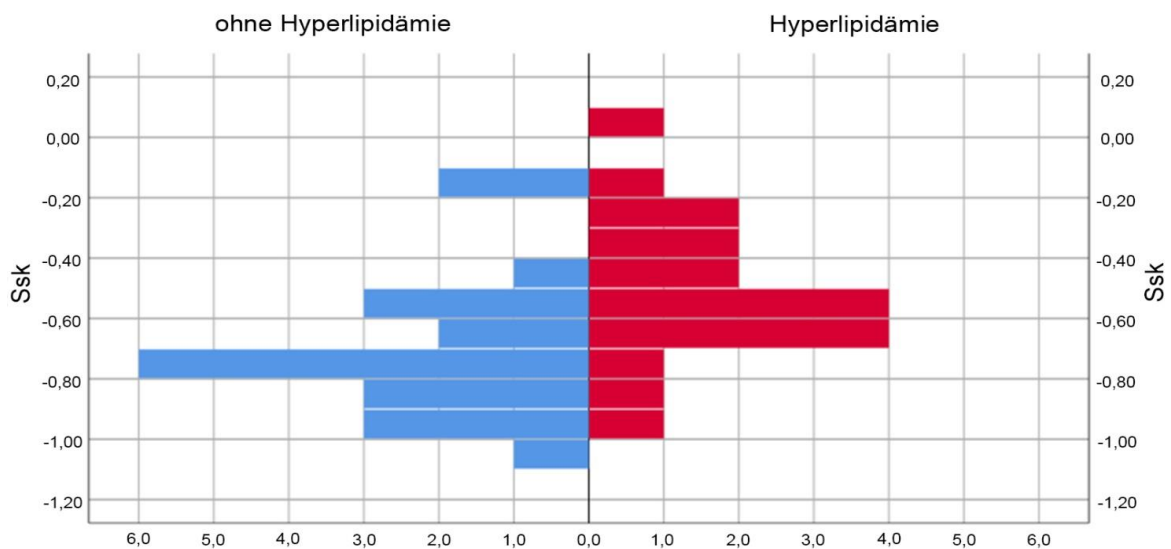


Abbildung 4.13: Histogramm der Verteilung des Parameters Ssk des Innenarms (siehe Tab. 7.1 im Anhang) für die Gruppe der Patienten ohne die Diagnose einer Hyperlipidämie (links) oder mit der Diagnose einer Hyperlipidämie (rechts)

Der Zusammenhang zwischen Ssk und HLP wurde im Folgenden unter Berücksichtigung weiterer Parameter näher untersucht. Als mögliche Verbindung zwischen Stoffwechselstörungen und Veränderungen der Haut wären Ablagerungsprodukte denkbar, die in der Haut deponiert werden und ihr Erscheinungsbild verändern. Hierfür kämen zum Beispiel AGE (Advanced Glycation Endproducts) in Frage, die mit Glukosespiegeln und Diabetes assoziiert sind. Allerdings wies nur ein Patient von 46 Patienten die Diagnose eines Diabetes auf, so dass diese Frage nicht beantwortet werden konnte. Jedoch scheint bemerkenswert, dass dieser eine Patient einen relativen hohen Wert von Ssk ( $> -0,20$ ) aufwies, in Übereinstimmung mit der Tatsache, dass dieser Patient auch eine HLP aufwies. Zwei weitere Biomarker, die mit systemischer Alterung in Verbindung gebracht werden, sind LL-37 [Lucke, 2015] und die Telomerenlänge von Blutleukozyten. Messwerte hierfür standen von einer früheren Visite der Patienten zur Verfügung; aufgrund des zeitlichen Abstandes sind die Vergleiche nur mit Vorbehalt zu werten. Abbildung 4.14 zeigt den Zusammenhang dieser beiden Biomarker mit Ssk und Sp. Es ist zu erkennen, dass kein klarer Zusammenhang bestand. Dies bestätigte sich in der Berechnung von Spearman-Korrelationskoeffizienten.

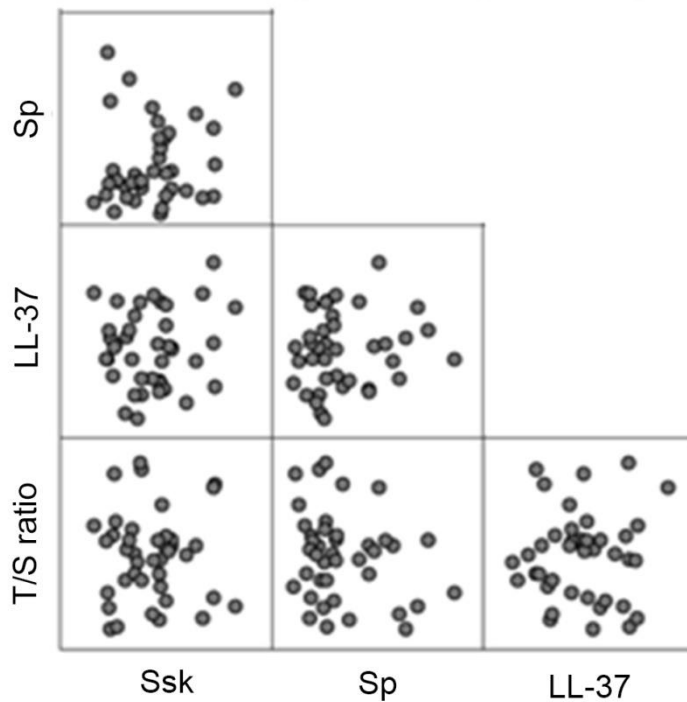


Abbildung 4.14: Beziehungen zwischen LL-37 und der Telomerenlänge von Blutleukozyten und den Parametern der Hautbeschaffenheit Sp und Ssk (siehe Anhang Tab. 7.1). Es zeigte sich kein klarer Zusammenhang, was sich in der Berechnung der Korrelationskoeffizienten bestätigte

### Parameter des Auges

Bezüglich der Hautparameter des Auges und der Komorbiditäten fanden sich signifikante (jeweils  $p < 0,05$ ) Unterschiede für gastrointestinale Erkrankungen und die mittlere Tiefe der Falten, die tiefste Falte sowie das Faltenvolumen, ferner für Hypertonie und Faltenlänge, sowie für Koronare Herzerkrankung und die Variable „Mittlerer Falten-Formfaktor“. In allen diesen Fällen waren die betreffenden Parameter im Falle des Vorliegens der entsprechenden Komorbidität reduziert.

Da bei den Komorbiditäten von zusätzlichen Einflussfaktoren auszugehen ist, wurden Kovarianzanalysen durchgeführt, in denen der jeweilige Parameter als abhängige Variable fungierte und die jeweilige Komorbidität als Prädiktor zusammen mit den potentiellen Einflussfaktoren Geschlecht, Alter, BMI, Packyears und Rauchstatus (aktiv ja/nein).

Hierbei fanden sich für die Zusammenhänge folgende Ergebnisse: Gastrointestinale Erkrankungen versus mittlere Tiefe der Falten  $p=0,064$ , tiefste Falte  $p=0,094$ , sowie Faltenvolumen  $p=0,078$ ; Hypertonie versus Faltenlänge  $p=0,035$ ; sowie koronare Herzerkrankung versus „Mittlere Falten-Formfaktor“  $p=0,124$ . Wenn als zusätzliche Prädiktoren gastrointestinale Erkrankungen, Koronare Herzerkrankungen sowie Hy-

perlipidämie eingeführt wurden, verblieb in einer schrittweisen Regression die Hypertonie signifikant ( $p=0,045$ ). Somit verblieb die Beziehung zwischen Hypertonie und Faltenlänge als robust. Dieses Ergebnis legt nahe, dass es Beziehungen zwischen Hautparametern des Auges und zumindest Hypertonie als Komorbidität der COPD gibt. Allerdings sind die Mechanismen unklar (siehe Diskussion).

#### **4.2.4 Zusammenhang mit vaskulärer Funktion und Entzündungsparametern**

##### *Knöchel-Arm-Index*

Zwischen den Hautparametern des Augenaußenwinkels sowie des Innenarmes und dem Knöchel-Arm-Index (ABI) fanden sich keine signifikanten Beziehungen. Stellte man die Hautparameter in Beziehung zu den gemessenen systolischen Blutdruckwerten, so zeigten sich hingegen signifikante Korrelationen für Parameter des Auges, und zwar speziell für die mittlere Tiefe der größten Falte sowie die maximale Tiefe der größten Falte ( $p<0,05$ ). Führt man eine Regressionsanalyse mit den Hautparametern als abhängiger und dem systolischen Blutdruckwert als unabhängiger Variable sowie den Kovariaten Alter, Geschlecht, BMI, Raucherstatus und Packyears durch, zeigte sich eine grenzwertige Signifikanz für die mittlere Tiefe der größten Falte ( $p=0,051$ ), der Zusammenhang zur maximalen Tiefe der größten Falte verhielt sich ähnlich ( $p=0,072$ ).

##### *Entzündungsparameter*

In einem weiteren Schritt wurden die verschiedenen Hautparameter zu Entzündungsmarkern (CRP und Leukozytenzahl) in Beziehung gesetzt. Hier zeigten sich statistisch signifikante Zusammenhänge ( $p<0,05$ ) zwischen CRP und einer Vielzahl von Hautparametern des Innenarmes (Sa, Sq, Smax, Sz, St, Sv, Sda, Sdq, Sla; siehe Tab. 7.1 im Anhang). Wenn die Kovariaten Alter, Geschlecht, BMI, Raucherstatus sowie Packyears zusätzlich als Prädiktoren der Hautparameter eingeführt wurden, bestätigten sich die Zusammenhänge nur für Sa ( $p=0,049$ ), Sq ( $p=0,050$ ) und Sla ( $p=0,020$ ). Für diese Analysen wurden aufgrund der schiefen Verteilung logarithmierte Werte von CRP verwendet. Für die Parameter des Innenarms und die Leukozytenzahl im Blut fanden sich keine signifikanten Beziehungen.

Hingegen zeigte sich für die Parameter der Hautalterung am Augenaußenwinkel eine statistisch signifikante Beziehung zwischen der Anzahl der Falten und der Zahl der Leukozyten ( $p < 0,05$ ), die sich in einer Regressionsanalyse mit den genannten fünf Kovariaten jedoch nicht bestätigte. CRP zeigte keinerlei Beziehungen zu der Hautalterung am Augenaußenwinkel, weder für sich alleine noch unter Berücksichtigung von Kovariaten.

Diese Ergebnisse lassen es zweifelhaft erscheinen, dass genuine Zusammenhänge zwischen Leukozyten und Hautalterung bestehen. Die Ergebnisse für CRP lassen eine solche Beziehung als möglich erscheinen, indem chronische Entzündung möglicherweise Alterung fördert.

## 4.3 Molekulare Marker von Alterung und Regeneration

### 4.3.1 Beziehungen zwischen der Expression verschiedener Gene

Bei 44 Patienten konnten Blutproben zur Bestimmung der Expression verschiedener alterungsassoziierter Gene ausgewertet werden. Die Mittelwerte der relativen Expression dieser Gene, standardisiert auf einen Satz von Referenzgenen (siehe Methode, insbesondere die Formel in Kap. 3.4.4), sind in Tabelle 4.13 dargestellt.

ATM	CAT	CDKN1A	FOXO1	KL	LMNA	SIRT
0,980 ±0,018	1,030 ± 0,016	0,981 ±0,017	0,970 ±0,014	0,981 ±0,038	1,000 ±0,019	0,997 ±0,012

SOD2	STAT3	TERF2	VEGFB	WRN	XRCC5	XRCC6
1,043 ±0,026	1,006 ±0,024	0,997 ±0,014	1,001 ±0,015	0,976 ±0,026	1,013 ±0,021	1,000 ±0,012

Tabelle 4.13: Mittelwerte und Standardabweichungen der Genexpressionen relativ zu den Referenzgenen. Um eine Tabelle mit nur zwei Spalten zu vermeiden, wurden die Parameter zeilenweise angeordnet

In der Etablierungsphase der molekularbiologischen Methoden, mit denen die Alterungsmarker gemessen wurden, wurden zu Test- und Optimierungszwecken auch Daten von anamnestisch lungengesunden Personen gewonnen. Hierbei

handelte es sich um 11 freiwillige Blutspender (64% Frauen, mittleres Alter 43 Jahre); und diese werden im Folgenden als Kontrollgruppe herangezogen, auch wenn ein Vergleich mit der COPD-Gruppe ursprünglich nicht geplant war und daher keine Funktions- oder andere Daten vorliegen. Jedoch sollen die Daten zumindest kurz erwähnt werden, da sie für einen Vergleich interessant sein könnten. Die Genexpression der Patienten mit COPD unterschied sich signifikant von der Gruppe der Kontrollen (Mann-Whitney-U-Test). Da Gruppen-Unterschiede in der mittleren Expression eine Korrelation zwischen verschiedenen Genen nicht zwingend stören müssen, sofern beide zu korrelierenden Gene von den Gruppenunterschieden betroffen sind, sind im Folgenden Korrelationsanalysen sowohl für die Gesamtgruppe als auch die COPD-Gruppe dargestellt.

In der Gesamtgruppe (Kontrollen und COPD) sowie in der COPD-Gruppe zeigten die Gene untereinander teils hohe Korrelationen (siehe Tabelle 4.14 und 4.15). Angesichts der Vielfachheit der Vergleiche muss man allerdings mit einer erhöhten Rate an falsch-positiven Ergebnissen rechnen. Dem kann man durch eine Absenkung des geforderten Signifikanzniveaus begegnen. Aus diesem Grunde sind in Tabelle 4.16 diejenigen Korrelationen markiert, die auf einem Signifikanzniveau  $p < 0,01$  bzw.  $p < 0,001$  sowohl für die Gesamtgruppe als auch die COPD-Gruppe bestanden. Man erkennt, dass für Katalase überhaupt keine Korrelationen bestanden, während für XRCC5 und XRCC6 multiple, relativ robuste Korrelationen existierten. Insgesamt waren die Ergebnisse der Analysen sehr ähnlich, jedoch die der COPD-Gruppe homogener. Aus diesem Grunde wurde im Folgenden primär auf Basis der COPD-Gruppe gearbeitet.

Um die Korrelation zwischen den Expressionen der verschiedenen Gene besser zu verstehen, erfolgten explorative Faktorenanalysen (Hauptkomponentenmethode), in denen versucht wurde, Gruppen von Variablen derart zu bestimmen, dass innerhalb einer Gruppe die Variablen möglichst gut korrelierten, die Gruppen (Komponenten, Faktoren) jedoch möglichst nicht miteinander korrelierten. Hierbei konnten vier Faktoren identifiziert werden, deren Eigenwerte 4,861, 3,269, 2,021 und 1,408 in der COPD-Gruppe betrugen, die zusammen genommen 82,5% der Varianz erklärten. Hierbei ist ein Eigenwert ein Maß dafür, wie viele Variablen durch den Faktor erklärt werden; entsprechend sind Eigenwerte  $< 1$  weggelassen. Die Ladungen jeder Variablen auf jeden Faktor sind ein Maß der Korrelation zu dem jeweiligen Faktor.

	ATM	CAT	CDKN1A	FOXO	Klotho	LMNA	SIRT1	SOD2	STAT3	TERF2	VEGFB	WRN	XRCC5	XRCC6
ATM				R=0,454 p=0,002		R=0,414 p=0,005						R=0,342 p=0,023	R=0,682 p=<0,001	
CAT			R=0,369 p=0,014			R=0,357 p=0,017			R=0,315 p=0,037					
CDKN1A		R=0,369 p=0,014			R=0,439 p=0,003	R=0,406 p=0,006								
FOXO	R=0,454 p=0,002						R=0,562 p=<0,001			R=0,591 p=<0,001		R=0,326 p=0,031		R=0,479 p=0,001
Klotho			R=0,439 p=0,003					R=0,559 p=<0,001	R=0,629 p=<0,001	R=0,471 p=0,001				
LMNA	R=0,414 p=0,005	R=0,357 p=0,017	R=0,406 p=0,006						R=0,306 p=0,043		R=0,309 p=0,041	R=0,455 p=0,002	R=0,655 p=<0,001	R=0,380 p=0,011
SIRT1	R=0,303 p=0,049			R=0,562 p=<0,001						R=0,637 p=<0,001	R=0,534 p=<0,001	R=0,468 p=0,002		R=0,562 p=<0,001
SOD2					R=0,559 p=<0,001				R=0,907 p=<0,001			R=0,380 p=0,011	R=0,599 p=<0,001	R=0,388 p=0,009
STAT3		R=0,315 p=0,037			R=0,629 p=<0,001	R=0,306 p=0,043		R=0,907 p=<0,001			R=0,374 p=0,012	R=0,463 p=0,002	R=0,598 p=<0,001	R=0,497 p=0,001
TERF2				R=0,591 p=<0,001	R=0,471 p=0,001		R=0,637 p=<0,001				R=0,504 p=<0,001	R=0,541 p=<0,001		R=0,541 p=<0,001
VEGFB						R=0,309 p=0,041	R=0,534 p=<0,001		R=0,374 p=0,012	R=0,504 p=<0,001		R=0,822 p=<0,001	R=0,447 p=0,002	R=0,720 p=<0,001
WRN	R=0,342 p=0,023			R=0,326 p=0,031		R=0,455 p=0,002	R=0,468 p=0,002	R=0,380 p=0,011	R=0,463 p=0,002	R=0,541 p=<0,001	R=0,822 p=<0,001		R=0,615 p=<0,001	R=0,776 p=<0,001
XRCC5	R=0,682 p=<0,001					R=0,655 p=<0,001		R=0,599 p=<0,001	R=0,598 p=<0,001		R=0,447 p=0,002	R=0,615 p=<0,001		R=0,550 p=<0,001
XRCC6				R=0,479 p=0,001		R=0,380 p=0,011	R=0,562 p=<0,001	R=0,388 p=0,009	R=0,497 p=0,001	R=0,541 p=<0,001	R=0,720 p=<0,001	R=0,776 p=<0,001	R=0,550 p=<0,001	

Tabelle 4.14: Korrelationen der Genexpressionen untereinander in der COPD-Gruppe alleine genommen. Gezeigt sind jeweils die Korrelationskoeffizienten nach Spearman und die zugehörigen p-Werte. Um diejenigen Korrelationen hervorzuheben, die kleine p-Werte aufwiesen und somit gegenüber einer möglichen Korrektur für die Vielfachheit der Testung robust waren, wurden die betreffenden Korrelationen farbig markiert. Hellblau sind die Korrelationen, die nur auf dem konventionellen Signifikanzniveau von  $p=0,05$  signifikant waren, grau diejenigen, die auf dem Niveau  $<0,01$  signifikant waren, dunkelgrau diejenigen, die auf dem Niveau  $<0,001$  signifikant waren



	ATM	CAT	CDKN1A	FOXO	Klotho	LMNA	SIRT1	SOD2	STAT3	TERF2	VEGFB	WRN	XRCC5	XRCC6
ATM				R=0,473 p=<0,001		R=0,436 p=<0,001	R=0,337 p=0,006	R=0,290 p=0,018		R=0,266 p=0,031	R=0,339 p=0,005		R=0,591 p=<0,001	
CAT			R=0,321 p=0,009						R=0,300 p=0,014				R=0,321 p=0,008	
CDKN1A		R=0,321 p=0,009			R=0,276 p=0,026	R=0,253 p=0,04					R=0,279 p=0,023		R=0,311 p=0,011	
FOXO	R=0,473 p=<0,001						R=0,444 p=<0,001				R=0,515 p=<0,001	R=0,252 p=0,041		R=0,378 p=0,002
Klotho			R=0,276 p=0,026					R=0,318 p=0,010	R=0,685 p=<0,001			R=0,411 p=0,001		R=0,310 p=0,012
LMNA	R=0,436 p=<0,001		R=0,253 p=0,040					R=0,481 p=<0,001	R=0,389 p=0,001		R=0,384 p=0,001		R=0,502 p=<0,001	R=0,449 p=<0,001
SIRT1	R=0,337 p=0,006			R=0,444 p=<0,001					R=0,287 p=0,021	R=0,720 p=<0,001		R=0,668 p=<0,001		R=0,376 p=0,002
SOD2	R=0,290 p=0,018				R=0,318 p=0,010	R=0,481 p=<0,001			R=0,681 p=<0,001		R=0,303 p=0,013		R=0,465 p=<0,001	R=0,436 p=<0,001
STAT3		R=0,300 p=0,014			R=0,685 p=<0,001	R=0,389 p=0,001	R=0,287 p=0,021	R=0,681 p=<0,001			R=0,324 p=0,008	R=0,566 p=<0,001	R=0,614 p=<0,001	R=0,606 p=<0,001
TERF2	R=0,266 p=0,31			R=0,515 p=<0,001			R=0,720 p=<0,001					R=0,585 p=<0,001		R=0,303 p=0,013
VEGFB	R=0,339 p=0,005		R=0,279 p=0,023			R=0,384 p=0,001		R=0,303 p=0,013	R=0,324 p=0,008			R=0,465 p=<0,001		R=0,719 p=<0,001
WRN				R=0,252 p=0,041	R=0,411 p=0,001		R=0,668 p=<0,001		R=0,566 p=<0,001	R=0,585 p=<0,001	R=0,465 p=<0,001		R=0,498 p=<0,001	R=0,655 p=<0,001
XRCC5	R=0,591 p=<0,001	R=0,321 p=0,008	R=0,311 p=0,011			R=0,502 p=<0,001		R=0,465 p=<0,001	R=0,614 p=<0,001			R=0,498 p=<0,001		R=0,506 p=<0,001
XRCC6				R=0,378 p=0,002	R=0,310 p=0,012	R=0,449 p=<0,001	R=0,376 p=0,002	R=0,436 p=<0,001	R=0,606 p=<0,001	R=0,303 p=0,013	R=0,719 p=<0,001	R=0,655 p=<0,001	R=0,506 p=<0,001	

**Tabelle 4.15:** Korrelationen der Genexpressionen untereinander in Kontrollgruppe und COPD-Gruppe zusammengenommen. Gezeigt sind jeweils die Korrelationskoeffizienten nach Spearman und die zugehörigen p-Werte. Um diejenigen Korrelationen hervorzuheben, die kleine p-Werte aufwiesen und somit gegenüber einer möglichen Korrektur für die Vielfachheit der Testung robust waren, wurden die betreffenden Korrelationen farbig markiert. Hellblau sind die Korrelationen, die nur auf dem konventionellen Signifikanzniveau von  $p=0,05$  signifikant waren, grau diejenigen, die auf dem Niveau  $<0,01$  signifikant waren, dunkelgrau diejenigen, die auf dem Niveau  $<0,001$  signifikant waren. Die Tabelle soll veranschaulichen, welche komplexen Beziehungen zwischen den Parametern bestanden, sodass eine integrative Analyse erforderlich war, für die u.a. das Verfahren der Faktorenanalyse eingesetzt wurde

Die rotierte Komponentenmatrix für die COPD-Gruppe (Tabelle 4.14) ist in Tabelle 4.16 dargestellt. FOXO1, SIRT1, TERF2, VEGFB, (WRN) und XRCC6 gehörten zu dem ersten Faktor; ATM, LMNA und XRCC5 gehörten zum zweiten Faktor; Klotho, SOD2 und STAT3 zum dritten Faktor; CAT und CDKN1A zum vierten Faktor. Ferner ist zu erkennen, dass für die Mehrzahl der Gene (ATM, LMNA, Klotho, XRCC5, SOD2, STAT3, CAT sowie CDKN1A) eine klare Zuordnung möglich war, während einige Gene (WRN und XRCC6) nicht klar einem einzelnen Faktor zugeordnet werden konnten. Hierbei galt eine Faktorladung vom Betrag  $\geq 0,7$  als Kriterium einer klaren Zuordnung. Dieses Muster der Korrelationen lässt sich auch bei Betrachtung der paarweisen Korrelationen in Tabelle 4.14 erkennen.

	Komponente			
	1	2	3	4
ATM	0,285	<b>0,888</b>	0,064	-0,106
CAT	-0,046	0,045	0,325	<b>0,781</b>
CDKN1A	0,072	0,257	-0,394	<b>0,799</b>
FOXO1	<b>0,756</b>	0,393	-0,051	-0,306
KL	0,241	-0,056	<b>0,886</b>	-0,136
LMNA	-0,074	<b>0,736</b>	0,166	0,366
SIRT1	<b>0,874</b>	0,231	-0,011	-0,018
SOD2	-0,08	0,219	<b>0,813</b>	0,127
STAT3	-0,213	0,329	<b>0,877</b>	0,117
TERF2	<b>0,886</b>	0,034	0,234	0,048
VEGFB	<b>-0,717</b>	0,451	0,193	-0,134
WRN	-0,643	0,514	0,447	-0,071
XRCC5	-0,03	<b>0,865</b>	0,208	0,218
XRCC6	-0,632	0,442	0,523	0,006

Tabelle 4.16: Rotierte (Varimax) Ladungsmatrix einer Faktorenanalyse (Hauptkomponenten), in die alle Expressionen der Alterungsgene in der COPD-Gruppe eingingen. Ladungen mit einem Betrag über 0,7 sind fett markiert

Bei Anwendung der Faktorenanalyse auf die Gesamtgruppe (Kontrollgruppe und COPD-Gruppe, Tabelle 4.15) zeigte sich ein praktisch identisches Muster der Verteilung der Faktorladungen. Die Ergebnisse dieser Analysen ergaben somit, dass es bis zu vier Gruppen von Genen gab, die jeweils eine gemeinsame Expression zeigten. Aus diesem Grunde sollten auch bei den Korrelationsanalysen mit funktionellen Parametern bzw. Messgrößen der Hautalterung die Korrelationen, soweit vorhanden, entsprechend gruppiert sein.

#### **4.3.2 Zusammenhang mit Lungenfunktion und Emphysemscore**

Gemäß der Fragestellung der Arbeit wurden im nächsten Schritt die molekularen Alterungsmarker zu anderen Daten der Patienten, einschließlich solchen der Lungenfunktion, in Beziehung gesetzt. Hintergrund war, dass diese Marker vor allem zu den Charakteristika eines Lungenemphysems in Beziehung stehen könnten. Eine Analyse der Korrelationskoeffizienten zeigte, dass zwischen den Genexpressionen und FEV<sub>1</sub> %Soll, RV/TLC sowie TLCO %Soll kein statistisch signifikanter Zusammenhang bestand. Für einen anderen Parameter der Diffusionskapazität (KCO %Soll) hingegen fanden sich Zusammenhänge mit der Genexpression. Insbesondere zeigten sich signifikante Korrelationen (Spearman) zwischen KCO %Soll einerseits und SOD2 ( $p=0,021$ ), STAT3 ( $p=0,016$ ) sowie CDKN1A ( $p=0,032$ ) andererseits. Führt man eine lineare Regression mit den Kovariaten BMI, Alter, Geschlecht, Raucherstatus sowie Packyears durch, fanden sich allerdings keine Signifikanzen mehr. Bei einer schrittweisen Selektion der Variablen waren die Ergebnisse je nach Auswahlstrategie (vorwärts versus rückwärts) uneindeutig.

Eine weitere Korrelation wies der berechnete Emphysemscore (siehe Methode) mit CDKN1A (p21) in Blutzellen ( $p=0,011$ ) auf. Um zu eruieren, ob diese Korrelation durch Kovariaten zustande kam bzw. gestört wurde, wurde eine lineare Regresionsanalyse durchgeführt, bei welcher der Score als abhängige Variable fungierte. BMI, Alter, Geschlecht, Raucherstatus sowie Packyears wurden wie zuvor als Kovariate eingeführt. Ungeachtet dessen fand sich eine signifikante ( $p=0,023$ ) Beziehung des Emphysemscores mit der Expression von p21. Die Ergebnisse der Regressionsanalyse sind in Tabelle 4.17 dargestellt. Da der Emphysemscore mit der Diffusionskapazität für CO zusammenhängt, war das Ergebnis damit konsistent, dass sich ebenfalls eine Beziehung zwischen CDKN1A und KCO %Soll fand (siehe oben).

Die Korrelation mit CDKN1A war auch konsistent mit den Korrelationen, die dieses Gen mit PaO<sub>2</sub> und CaO<sub>2</sub> zeigte (siehe unten).

	Nicht standardisierte Koeffizienten		Standardisierte Koeffizienten	t	p
	Regressionskoeffizient B	Std.-Fehler	Beta		
(Konstante)	1,025	0,032		32,091	<0,001
Emphysemscore	-0,007	0,003	-0,383	-2,375	<b>0,023</b>
Alter (Jahre)	0,000	0,000	-0,228	-1,547	0,131
Geschlecht (m versus w)	-0,011	0,005	-0,327	-2,067	0,046
BMI (kg/m <sup>2</sup> )	0,000	0,001	0,107	0,659	0,514
Raucher (ja versus nein)	0,002	0,006	0,060	0,393	0,697
Packyears	-4,342 10 <sup>-5</sup>	0,000	-0,089	-0,557	0,581

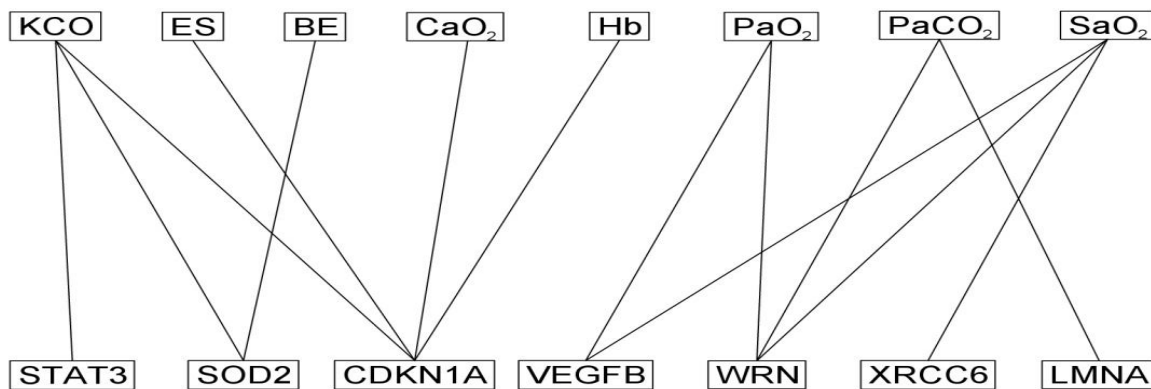
**Tabelle 4.17:** Regressionskoeffizienten (nicht standardisiert (B) und standardisiert (Beta)) für die Beziehung zwischen der Genexpression von p21 (abhängige Variable, CDKN1A) und den fünf angegebenen Prädiktoren in einer multiplen linearen Regressionsanalyse. Die Korrelation zum berechneten Emphysemscore blieb auch in Anwesenheit der Kovariaten signifikant (fett markiert). t ist der Wert der entsprechenden t-verteilten Bewertungsgröße und p der jeweilige Signifikanzlevel

### 4.3.3 Zusammenhang mit den Blutgasen

Des Weiteren wurde ein möglicher Zusammenhang zwischen den Expressionsmarkern und den Blutgasen untersucht. Dies erfolgte vor dem Hintergrund, dass die Blutgaswerte unter anderem mit dem Gefäßstatus und dem Zustand der Lunge zusammenhängen könnten, und diese wiederum mit einer biologischen Alterung. Entsprechend ließ sich ein Zusammenhang zwischen dem Sauerstoffpartialdruck PaO<sub>2</sub> und der Expression von VEGFB (p=0,017) und WRN (p=0,014), sowie zwischen der Sauerstoffsättigung SaO<sub>2</sub> und der Expression von VEGFB (p=0,028), WRN (p=0,002) und XRCC6 (p=0,024) nachweisen. Ferner korrelierte PaCO<sub>2</sub> mit LMNA (p=0,020) und WRN (p=0,033), ebenso der Base-Excess (BE) mit SOD2 (p=0,045).

Diese Ergebnisse legten die Vermutung nahe, dass auch der berechnete Sauerstoffgehalt des Blutes CaO<sub>2</sub> eine signifikante Beziehung zu den Genexpressionen aufweisen könnte, was für p21 (p=0,033) bestätigt wurde. In die Berechnung von CaO<sub>2</sub>

gehen die Sauerstoffsättigung und der  $\text{PaO}_2$ , sowie der Hämoglobingehalt des Blutes ein. Entsprechend fand sich zwischen dem Hämoglobinwert Hb und p21 ebenfalls eine signifikante Korrelation ( $p=0,023$ ). Allerdings zeigten sich nach Einführung der fünf Kovariaten Alter, Geschlecht, BMI, Raucherstatus sowie Packyears keine signifikanten Beziehungen der molekularen Marker zu den Blutgasparametern mehr; dies legt die Vermutung nahe, dass die angegebenen Korrelationen primär durch gemeinsame Einflussgrößen bedingt waren. Die wechselseitigen Beziehungen sind für alle Blutgasparameter sowie KCO %Soll und den Emphysemscore in Abb. 4.15 veranschaulicht.



**Abbildung 4.15:** Schema der signifikanten Beziehungen zwischen den Blutgasparametern sowie KCO %Soll und ausgewählten Genexpressionen molekularer Alterungsmarker, wenn die 5 anthropometrischen Kovariaten nicht berücksichtigt wurden. Die Abbildung verdeutlicht, dass die Assoziationen in zwei Gruppen zerfielen, deren eine (rechts) von den respiratorisch bedingten Gaskonzentrationen abhing, während die andere (links) sowohl lungenstrukturelle als auch systemische Parameter umfasste. So hing VEGFB von Sauerstoffpartialdruck ( $\text{PaO}_2$ ) und Sauerstoffsättigung ( $\text{SaO}_2$ ) ab, nicht aber vom Sauerstoffgehalt ( $\text{CaO}_2$ ) und dem damit assoziierten Hb-Wert. Umgekehrt waren der Transferkoeffizient (KCO) sowie der Emphysemscore (ES) mit der Superoxiddismutase (SOD2) und dem Zellzyklusregulator p21 (CDKN1A) assoziiert, als möglicher Ausdruck oxidativer Belastung und zellulärer Seneszenz. Für eine umfassende statistische Analyse der Zusammenhänge beispielsweise mittels eines Pfadmodells wären wesentlich größere Fallzahlen als die der gegenwärtigen Studie erforderlich gewesen. Gleichwohl ist die Abbildung geeignet, die Zusammenhangsstruktur klinischer und funktioneller mit molekularbiologischen Markern zu veranschaulichen.

#### 4.3.4 Zusammenhang mit den Parametern der Hautabdrücke

##### *Innenarm*

Zwischen den Genexpressionen und den Parametern der Hautabdrücke der Innenseite des Armes fanden sich nur wenige signifikante Korrelationen (Spearman). Für die Analysen wurden exemplarisch die drei Hautparameter Sp, S und Ssk des Innenarms herangezogen, die jeweils einen der drei Faktoren aus der Faktorenanalyse am besten repräsentierten (siehe Tab. 4.8). Eine Korrelation bestand zwischen dem Parameter Sp und XRCC5 ( $p=0,055$ ) nur der Tendenz nach, jedoch zeigten sich signifikante Korrelationen zwischen dem Hautparameter S und der Expression der Gene SOD2, STAT3, WRN sowie XRCC5 ( $p=0,045$ , bzw.  $p=0,043$ , bzw.  $p=0,020$  bzw.  $p=0,032$ ). Führt man eine Regressionsanalyse mit den Genexpressionen als abhängigen und dem Hautparameter S als unabhängiger Variablen sowie den Kovariaten Alter, Geschlecht, BMI, Raucherstatus und Packyears durch, verblieben signifikante Zusammenhänge mit S nur für WRN ( $p=0,043$ ) und XRCC6 ( $p=0,046$ ).

##### *Augenaußenwinkel*

Ferner zeigte sich eine Korrelation zwischen der Anzahl der Falten am Auge und der Expression von SOD2 und STAT3 ( $p=0,014$  bzw.  $p=0,039$ ). Bei Berücksichtigung der fünf Kovariaten Alter, Geschlecht, BMI, Packyears sowie Raucherstatus entfielen allerdings beide Zusammenhänge. Als Repräsentant des zweiten Faktors, der die Parameter des Auges charakterisierte (siehe Tabelle 4.7), wurde das Faltenvolumen ausgewählt, das allerdings mit keiner der Genexpressionen signifikant korreliert war. Die Korrelationen waren insgesamt schwach, wie in Abbildung 4.16 für ausgewählte Parameter veranschaulicht, und die genannten Korrelationen waren die einzig statistisch signifikanten.

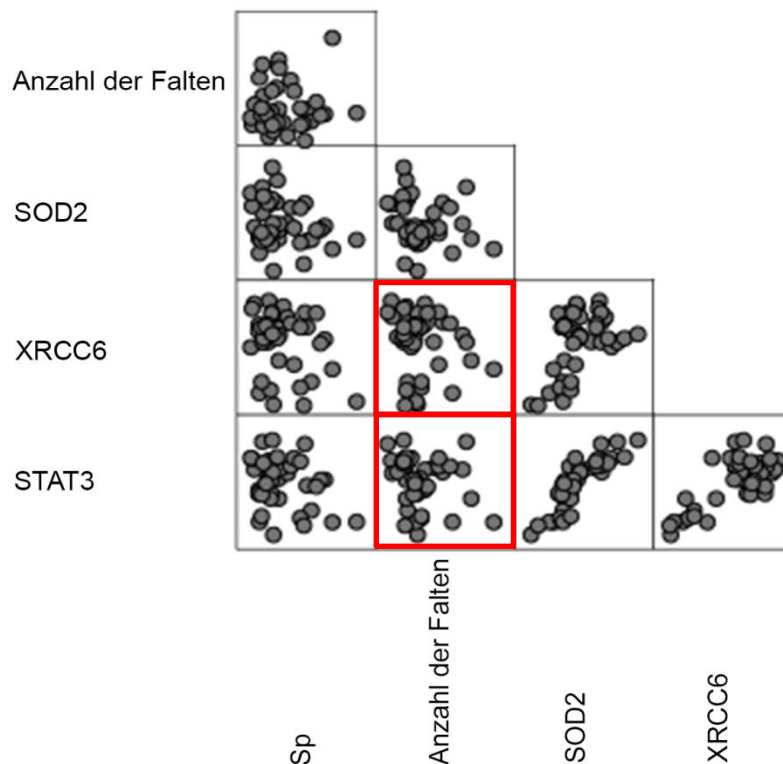


Abbildung 4.16: Beziehungen zwischen Sp als repräsentativem Parameter der Hautbeschaffenheit des Innenarms (siehe Tab. 7.1 im Anhang) sowie der Anzahl der Falten als repräsentativen Parametern der Hautbeschaffenheit des Auges und der Genexpression der molekularen Alterungsmarker SOD2 und XRCC6. Die signifikanten Korrelationen von Interesse sind rot markiert

#### 4.3.5 Zusammenhang mit anthropometrischen Messgrößen und Komorbiditäten

Als nächstes wurden weitere Einflussgrößen analysiert, die bei der chronisch-obstruktiven Lungenerkrankung von Bedeutung sind. Nach Spearman ergaben sich signifikante Korrelationen (jeweils  $p < 0,05$ ) zwischen BMI und SIRT1 ( $p = 0,002$ ), TERF2 ( $p < 0,001$ ), VEGFB ( $p = 0,001$ ), FOXO1 ( $p = 0,032$ ), WRN ( $p = 0,008$ ) sowie XRCC6 ( $p = 0,002$ ). Nach Durchführung von Regressionsanalysen, bei denen stets alle fünf Kovariaten einschließlich BMI als unabhängige und das Expressionssignal als abhängige Variable fungierten, verblieben signifikant die Zusammenhänge von BMI mit SIRT1 ( $p = 0,004$ ), TERF2 ( $p < 0,001$ ) sowie VEGFB ( $p = 0,013$ ). Die Korrelationen sind in Abbildung 4.17 dargestellt.

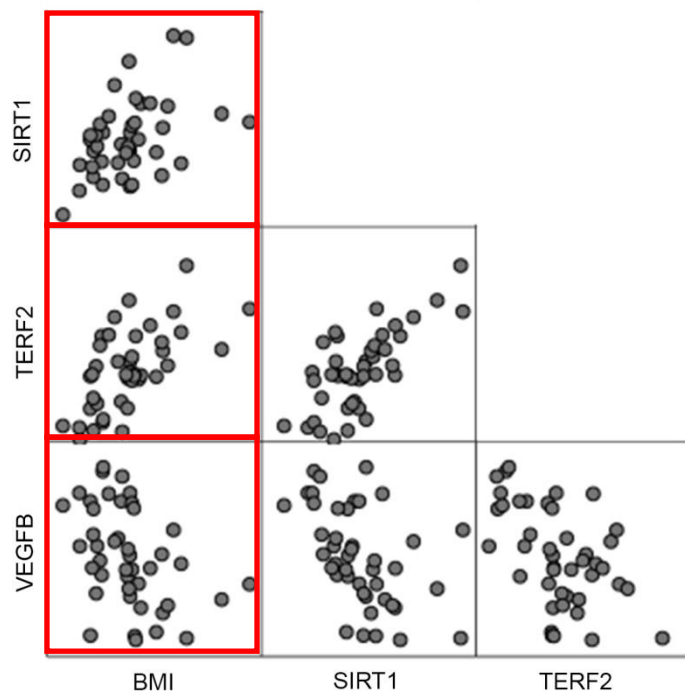


Abbildung 4.17: Beziehungen zwischen BMI und der Genexpression von zwei molekularen Markern. Alle Korrelationen waren signifikant ( $p < 0,05$ ). Die signifikanten Korrelationen von Interesse sind rot markiert

Zwischen den Komorbiditäten und den molekularen Alterungsmarkern fanden sich keine signifikanten Korrelationen. Dies war wahrscheinlich durch die relativ kleinen Fallzahlen der Komorbiditäten und einen vermutlich nur schwachen Zusammenhang bedingt.

Das Alter wies einen Zusammenhang mit der Genexpression von XRCC6 ( $p = 0,038$ ) auf. Der Einfluss des Risikofaktors Rauchen auf den Alterungsprozess zeigte sich zum einen in der Korrelation zwischen der Anzahl der Packyears und dem Gen SOD2 ( $p = 0,047$ ); diese Beziehung ist in Abbildung 4.18 veranschaulicht. Zum anderen wies der statistisch signifikante Korrelationskoeffizient zwischen TERF2 und Raucherstatus auf einen entsprechenden Zusammenhang hin ( $p = 0,044$ ). LMNA, Klotho und CDKN1A (p21) wiesen signifikante ( $p < 0,05$ ) Geschlechtsunterschiede in ihrer Expression auf (Mann-Whitney-U-Test).



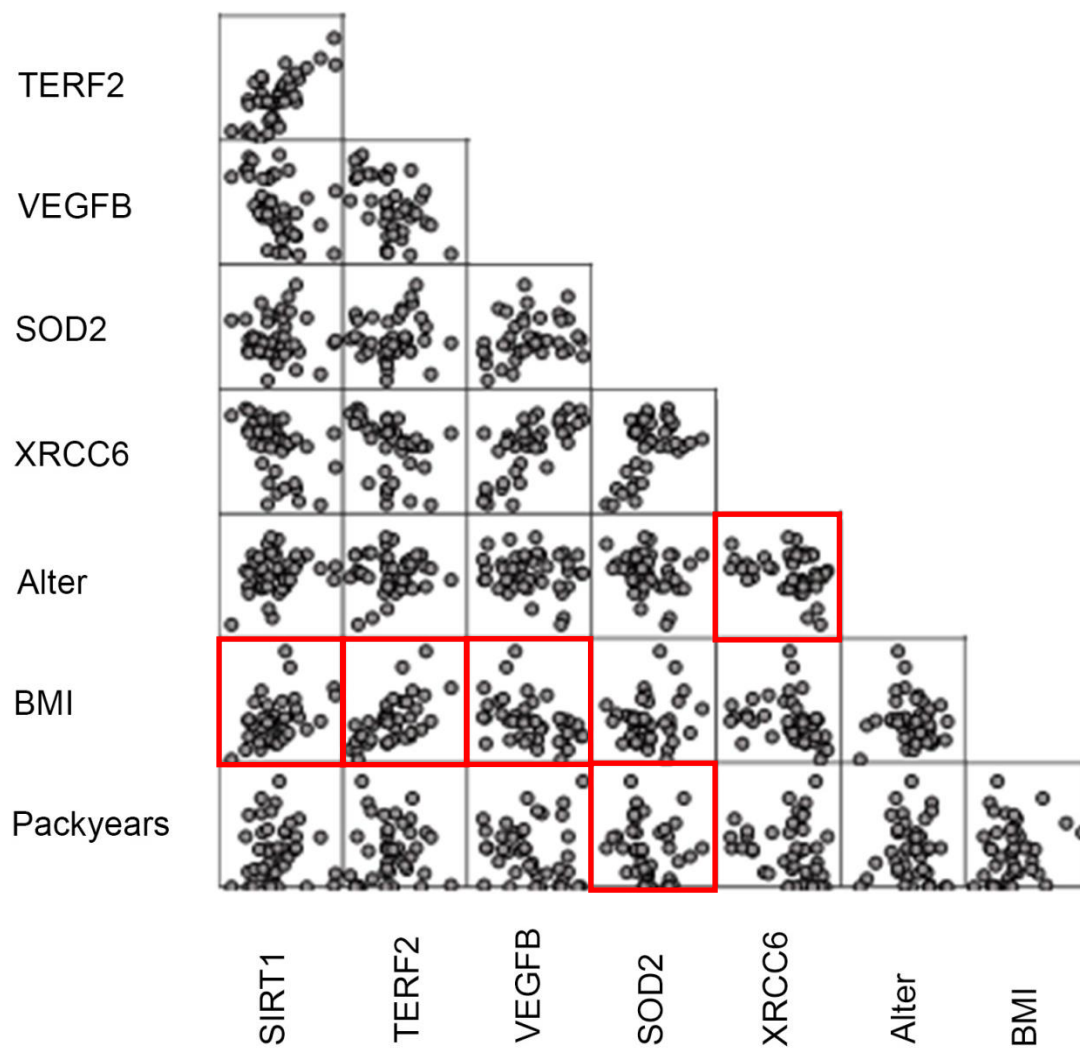
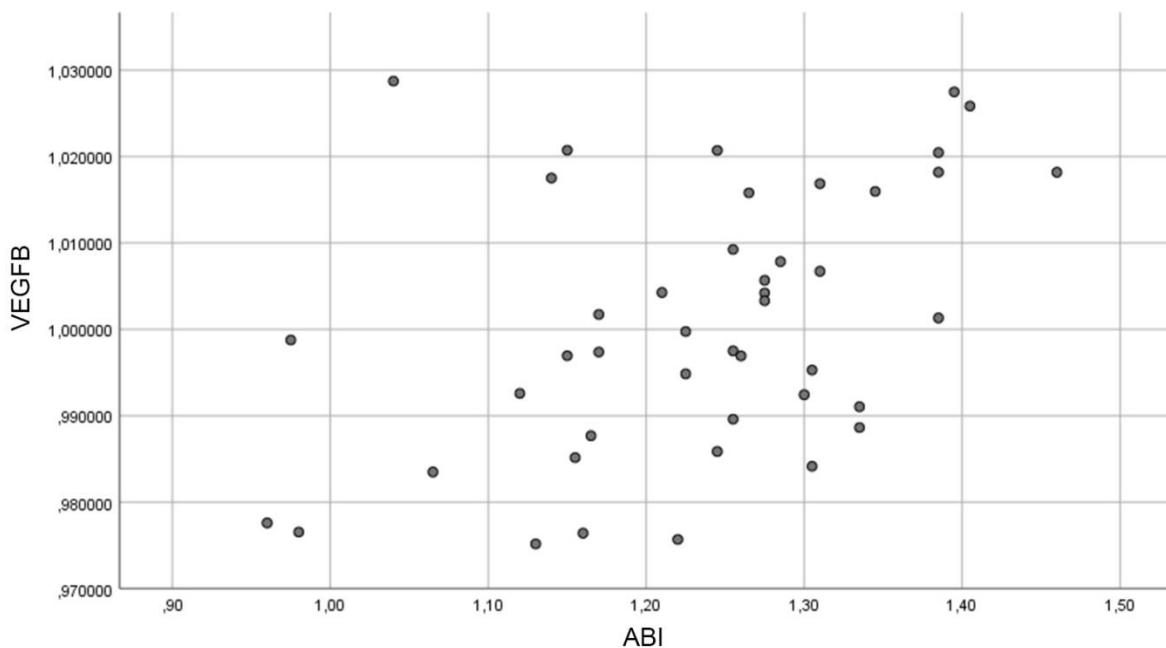


Abbildung 4.18: Erweiterte Korrelationsgrafik im Vergleich zu Abbildung 4.17: Beziehungen zwischen Alter, BMI sowie Packyears und der Genexpression von vier molekularen Markern. Die signifikanten Korrelationen von Interesse sind rot markiert

### 4.3.6 Zusammenhang mit vaskulärer Funktion und Entzündungsparametern

Zur Beschreibung des vaskulären Status wurde der Knöchel-Arm-Index (ABI) herangezogen. Dieser korrelierte signifikant ( $p < 0,05$ ; Spearman) mit den Expressionen von LMNA ( $p = 0,024$ ), WRN ( $p = 0,042$ ), VEGFB ( $p = 0,004$ ) sowie XRCC6 ( $p = 0,011$ ). Nach einer Regressionsanalyse mit den molekularen Markern als abhängigen sowie dem Knöchel-Arm-Index als unabhängiger Variablen und den fünf Kovariaten BMI, Geschlecht, Alter, Raucherstatus sowie Packyears blieb alleine die Signifikanz der Korrelation zwischen ABI und VEGFB ( $p = 0,036$ ) bestehen. Dieser Zusammenhang ist in Abbildung 4.19 illustriert. Darüber hinaus korrelierte der diastolische Blutdruck mit der Expression von p21 ( $p = 0,028$ ); unter Einbeziehung der Kovariaten verlor sich jedoch dieser Zusammenhang.



**Abbildung 4.19:** Beziehung zwischen Knöchel-Arm-Index (ABI) und der Genexpression von VEGFB. Die Beziehung war statistisch signifikant ( $p < 0,05$ ), auch nach Adjustierung für die im Text genannten Kovariaten

Als Entzündungsmarker wurden CRP und die Anzahldichte der Leukozyten im Blut gewählt. Da die CRP-Werte schief verteilt waren, wurden sie nach Transformation über ihren Zehnerlogarithmus ausgewertet. Hierbei stand CRP in Beziehung zu FOXO1 ( $p = 0,003$ ), SIRT1 ( $p = 0,004$ ) und TERF2 ( $p = 0,017$ ). Hier erwies sich in der Regressionsanalyse mit den fünf Kovariaten (siehe oben) nur die Korrelation zwi-

schen CRP und FOXO1 als robust ( $p=0,018$ ). Die Leukozytenzahl war korreliert mit SOD2 ( $p=0,027$ ), STAT3 ( $p=0,041$ ) und VEGFB ( $p=0,020$ ), wobei sich SOD2 und STAT3 auch nach der Regressionsanalyse mit Kovariaten als statistisch signifikant herausstellten ( $p=0,008$  bzw.  $p=0,024$ ). Die sich als robust erweisenden Beziehungen zu CRP und Leukozyten sind in Abb. 4.20 dargestellt; die Beziehungen waren im Allgemeinen schwach, allerdings waren die Expressionen von STAT3 und SOD2 gut miteinander korreliert.

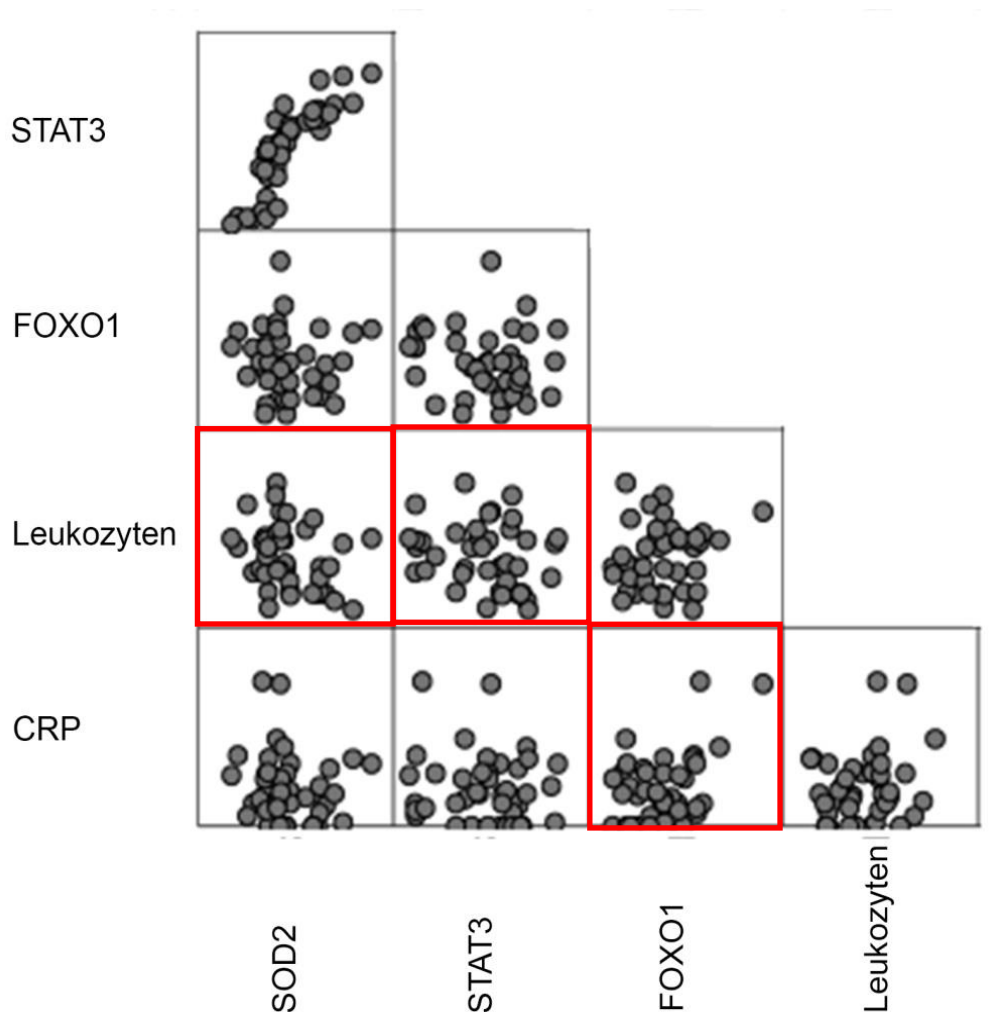


Abbildung 4.20: Beziehungen zwischen der Leukozytenzahl sowie CRP und der Genexpression der molekularen Alterungsmarker SOD2, STAT3 und FOXO1. Die signifikanten Korrelationen von Interesse sind rot markiert

### *Zusammenfassung der Resultate für die molekularen Marker*

Die molekularen Marker ließen sich vier Gruppen zuordnen, wobei die Marker innerhalb der Gruppen gut miteinander korrelierten, während die Gruppen miteinander eine geringe Korrelation zeigten. Dies ermöglichte es, sozusagen Repräsentanten der Gruppen in weitergehenden Korrelationsanalysen zu untersuchen. Bezüglich der Lungenfunktionsparameter wies p21 signifikante und robuste Zusammenhänge zum errechneten Emphysemscore auf; dies ist interessant unter dem Aspekt der Lungenalterung. WRN und XRCC6 standen zur Hautalterung (Parameter S) gemessen am Innenarm in Beziehung. Unter den anthropometrischen Parametern wies der BMI robuste Zusammenhänge zu SIRT1, TERF und VEGFB auf; hierunter erschien vor allem die Beziehung zu SIRT1 von Interesse. VEGFB zeigte ebenfalls eine Korrelation zum Gefäßstatus (Knöchel-Arm-Index). Des Weiteren zeigten sich signifikante und robuste Korrelationen zwischen CRP und FOXO1, sowie Leukozytenzahl, SOD2 und STAT3. Somit fanden sich Korrelationen der molekularen Marker sowohl mit Markern der Lungenerkrankung als auch solchen anderer Störungen, die bei der COPD vorkommen, einschließlich der Gefäßfunktion.

## **4.4 Fotoauswertung**

Für den Vergleich der Auswertungen der unterschiedlichen Untersucher miteinander wurden Korrelationskoeffizienten berechnet, welche eine gute Übereinstimmung der Ergebnisse zeigten. Die Korrelationskoeffizienten betrugen zwischen 0,659 und 0,842 für periorbitale Falten, sowie 0,535 und 0,774 für die nasolabialen Falten. Für die folgende Auswertung wurden die Mittelwerte der Ergebnisse der drei Auswerter verwendet.

### **4.4.1 Zusammenhang mit den Hautabdrücken**

Zwischen den photographisch bestimmten periorbitalen/nasolabialen Falten und den Parametern der Hautabdrücke der Innenseite des Armes sowie des Augenaußenwinkels fanden sich mehrere signifikante Korrelationen (Spearman,

jeweils  $p < 0,05$ ).

### *Augenaußenwinkel*

Zusammenhänge zeigten sich vor allem zwischen den periorbitalen Falten und der mittleren Tiefe der Falten, der tiefsten Falte, dem Faltenvolumen sowie der mittleren Tiefe der größten Falte des Augenaußenwinkels. Die nasolabialen Falten wiesen zudem noch einen Zusammenhang zur Faltenfläche sowie der maximalen Tiefe der größten Falte des Augenaußenwinkels auf (siehe Abb. 4.21).

Führte man eine Regressionsanalyse mit den Parametern der Hautabdrücke des Augenaußenwinkels als abhängigen und den Score-Werten der nasolabialen bzw. periorbitalen Falten als unabhängigen Variablen sowie den Kovariaten Alter, Geschlecht, BMI, Raucherstatus und Packyears durch, verblieben in einer schrittweisen Variablenauswahl signifikante ( $p < 0,05$ ) Zusammenhänge vor allem mit den mittleren Tiefen bzw. den Werten der tiefsten Falten, wobei auch das Geschlecht als signifikanter Faktor fungierte.

### *Innenarm*

Auch die Parameter der Hautabdrücke des Innenarms zeigten Korrelationen zu der Fotoauswertung, allerdings nur zu den nasolabialen Falten, im Besonderen zu Smax, Sz, St, Sp, Sla und Slq (siehe Tab. 7.1 im Anhang). Nach Durchführung der Regressionsanalysen mit den oben genannten Kovariaten verblieb nur die Beziehung zu Sp signifikant ( $p < 0,05$ ), bei Smax, Sz und St verblieb zusätzlich das Alter, bei Sla und Slq Alter und Geschlecht signifikant (siehe Abbildung 4.21). Diese Ergebnisse zeigten zusammengefasst, dass die Auswertung der Fotos und der Abdrücke miteinander konsistente Ergebnisse lieferte.

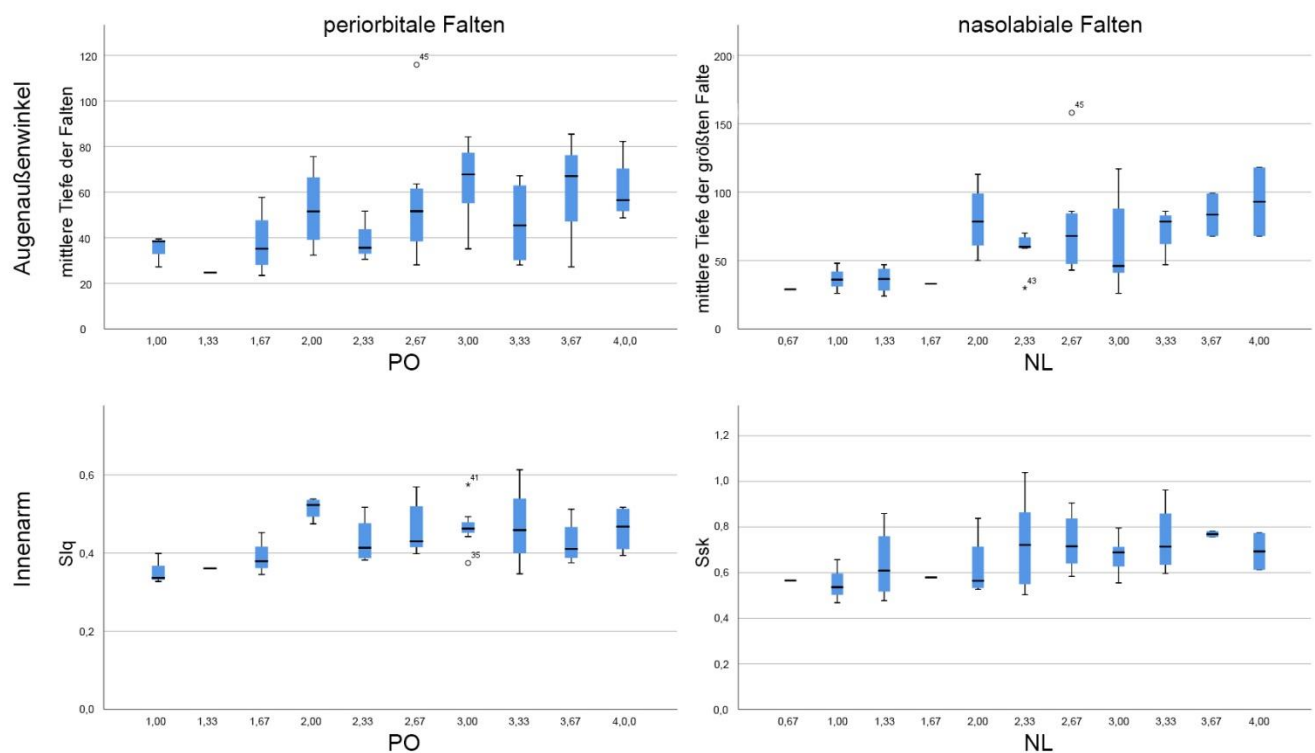


Abbildung 4.21: Beziehungen zwischen den über die drei Auswerter gemittelten periorbitalen und nasolabialen fotografischen Falten-Scores (horizontale Achse) sowie ausgewählten Parametern des Augenaußenwinkels (obere Teilbilder) und des Innenarms (untere Teilbilder), die mittels Replika-Technik bestimmt wurden

#### 4.4.2 Zusammenhang mit der Lungenfunktion

Die periorbitalen Falten zeigten einen Zusammenhang (nach Spearman) zum Tiffeneau-Index (Quotient aus  $FEV_1$  und FVC), welcher sich nach Durchführung der Regressionsanalysen mit Hinzunahme von Alter, Geschlecht, BMI Raucherstatus sowie Packyears als Kovariaten als nicht stabil zeigte, wobei Alter und Geschlecht als signifikante Faktoren blieben. Des Weiteren wiesen die periorbitalen Falten einen Zusammenhang mit  $TLCO$  %Soll auf, der nach Durchführung einer Regressionsanalyse mit den üblichen Kovariaten nicht mehr signifikant war. Jedoch korrelierten diese Falten mit dem BMI.

Die nasolabialen Falten korrelierten signifikant mit  $TLCO$  %Soll,  $KCO$  %Soll sowie dem Tiffeneau-Index. Auch nach Durchführung einer schrittweisen Regressionsanalyse mit den üblichen fünf Kovariaten blieb der Zusammenhang zu  $TLCO$  und  $KCO$  signifikant ( $p < 0,05$ ); zugleich verblieb die Beziehung zum BMI. Der Tiffeneau-Index

wurde nach Einführung der Kovariaten nicht-signifikant, mit den beiden signifikanten Kovariaten Alter und Geschlecht. Der Zusammenhang mit TLCO %Soll war ähnlich demjenigen, der sich bereits bei der Analyse der Parameter der Hautabdrücke des Innenarms als robust gezeigt hatte.

#### **4.4.3 Zusammenhang mit den Blutgasen**

Sowohl die nasolabialen als auch die periorbitalen Falten wiesen Korrelationen mit  $\text{PaCO}_2$  und dem Base-Excess BE auf. Bei schrittweisen Regressionsanalysen mit den üblichen Kovariaten erwiesen sich diese Zusammenhänge nicht als stabil.

Mögliche Zusammenhänge mit den Komorbiditäten wurden aufgrund der kleinen Fallzahlen nicht analysiert.

#### **4.4.4 Zusammenhang mit der Genexpression**

Die periorbitalen Falten-Scores in den Fotos zeigten keine statistisch signifikanten Zusammenhänge mit der Genexpression der molekularen Marker. Die nasolabialen Falten-Scores hingegen korrelierten signifikant mit SOD2 sowie STAT3. Auch nach Durchführung einer schrittweisen Regressionsanalyse mit den üblichen fünf Kovariaten blieben die Zusammenhänge mit SOD2 und STAT3 erhalten. Anzumerken ist, dass diese beiden Marker in der unadjustierten Analyse mit Parametern der Hautabdrücke des Innenarms korreliert waren (siehe 4.3.4). Insgesamt schienen somit Ähnlichkeiten zwischen der Fotoauswertung der nasolabialen Falten-Scores und den Abdrücken des Innenarms zu bestehen.

## **5 Diskussion**

### **5.1 Charakteristika der Patienten**

Die untersuchten Patienten entstammten der lokalen Kohorte (LMU München) der deutschlandweiten COPD-Studie COSYCONET. Mit einem mittleren Alter von 69 Jahren und einer Verteilung über die COPD-Schweregrade von 17,4% der Patienten im Stadium GOLD1, 43,5% GOLD2, 34,8% GOLD3 und 4,3% GOLD4 entsprachen die Patienten einem typischen Studienkollektiv von COPD-Patienten. Dies zeigte sich auch in der Verteilung der Komorbiditäten, allerdings war aufgrund der geringen Fallzahlen die statistische Analyse der Komorbiditäten nur sehr eingeschränkt möglich. Neben den typischen Veränderungen der spirometrischen und ganzkörperplethysmographischen Werte zeigten die Patienten teils deutliche Einschränkungen in der Diffusionskapazität sowie des errechneten Emphysemscores, in den die Diffusionskapazität an zentraler Stelle einging. Die Beziehungen zwischen den Funktionsparametern wurden in der vorliegenden Arbeit nicht näher analysiert, da dies bereits in vielen anderen Arbeiten geschehen ist und in Anbetracht der Fallzahlen keine wesentlich neuen Erkenntnisse zu erwarten waren. Da sich für die Zusammenhänge mit Alterungsmarkern allein die Parameter der Diffusionskapazität als informativ herausstellten, sind sie der Hauptgegenstand der folgenden Betrachtungen.

### **5.2 Methodologische Aspekte der Hautalterung**

Die Analyse des Zusammenhanges mit der COPD erfolgte mit zwei verschiedenen Ansätzen, erstens rein phänomenologisch mittels der relativ leicht zugänglichen Charakteristika der Haut, zweitens mittels eines Satzes von molekularen Markern, die aufgrund vorangegangener Studien und theoretischer Überlegungen für Alterungsprozesse relevant sein könnten. Die Hautalterung wurde bereits in früheren Studien untersucht, und zwar auf der Basis von Fotos des Gesichtes. Wenn diese Fotos im Hinblick auf Faltentiefe und andere Parameter analysiert wurden, fanden sich in der Tat Beziehungen zum Vorliegen eines Lungenemphysems, wie von Patel et al. [2006] gezeigt. Der Tendenz nach bestand ein solcher Zusammenhang auch in einer vorherigen Auswertung eines Subkollektivs von COSYCONET [Lucke, 2015].



Es ist bekannt, dass die Hautalterung von einer Vielzahl von Einflussfaktoren abhängt, insbesondere auch von der Exposition gegenüber UV-Strahlung [Kennedy et al., 2003]. Ferner wurde diskutiert, dass bei Zigarettenrauchern eine vorzeitige Hautalterung regelhaft auftritt, sei es durch systemische Veränderungen relevanter Gene oder durch lokale Veränderungen, die durch den über das Gesicht strömenden Rauch begünstigt werden [Frances et al., 1998; Leung & Harvey, 2002; Morita, 2007; Yin et al., 2001<sub>b</sub>]. In zahlreichen Arbeiten wurde bereits der Effekt von UV-Strahlung im Vergleich zum Zigarettenrauch analysiert [Izzotti et al., 2004; Yin et al., 2001<sub>b</sub>; Leung & Harvey, 2002].

Eine vor allem über Zigarettenrauchen vermittelte bzw. induzierte vorzeitige Alterung der Lunge beträfe ein inneres Organ, bei dem weitere Einflüsse, insbesondere die relativ starken Einflüsse der Strahlung, keine Rolle spielen. Sollte über diesen Weg eine vorzeitige Alterung der Lunge und in der Folge eine systemische Alterung hervorgerufen werden, so wäre dieser Effekt am ehesten an Stellen zu detektieren, die in nur geringem Maße weiteren potentiell alterungsinduzierenden Faktoren ausgesetzt sind. Dies war der wesentliche Grund, weshalb zusätzlich zum Augenaußenwinkel die Haut des Innenarms untersucht wurde. Bei hängenden Armen sowie hinreichender Bekleidung sollte diese Haut nur in geringem Maße der UV-Strahlung ausgesetzt sein. Alternativ wären andere Stellen wie Rücken oder Gesäß denkbar, jedoch waren diese aus Gründen der Praktikabilität keine Option. Im Nachhinein zeigte sich, dass die Wahl des Innenarms nicht nur gut durchführbar und von den Patienten akzeptiert, sondern auch aussagekräftig war.

Im Unterschied zu einer vorangegangenen Studie [Lucke, 2015] wurde ferner angestrebt, möglichst objektive Maße der Hautbeschaffenheit zu erheben, da die Bewertung von Fotos mit einer gewissen Variabilität der Beurteilung durch verschiedene Untersucher verbunden ist. Dies zeigte sich nicht nur in der genannten Untersuchung [Lucke, 2015], sondern auch in der gegenwärtigen Arbeit, die zum Vergleich ebenfalls Fotos des Gesichtes unter standardisierten Beleuchtungsbedingungen umfasste. Interessanterweise waren die Ergebnisse der Auswertung der Fotos des Gesichtes nicht nur den Ergebnissen der Hautabdrücke des Augenaußenwinkels ähnlich, sondern auch denen des Innenarms. Dies galt zum einen für die Korrelation der periorbitalen Falten der Fotos mit den Hautabdrücken des Augenaußenwinkels; dieses Ergebnis wies auf die Validität beider Auswertemethoden hin. Zum anderen bestanden

Beziehungen zwischen den nasolabialen Falten der Fotos und Parametern der Hautabdrücke des Innenarms. Zusätzliche standardisierte Fotos des Innenarms, die vielleicht wünschenswert gewesen wären, konnten aus Zeitgründen nicht genommen werden, da jede Visite bereits zwischen vier und fünf Stunden an Zeit in Anspruch nahm.

Die Methode der Hautabdrücke folgte publizierten Vorgehensweisen unter Zuhilfenahme eingeführter Materialien und Bildanalyseprozeduren [Yin et al., 2001<sub>a</sub>; Rubino et al., 2005]. Die ganz unterschiedliche Beschaffenheit der Haut des Augenaußenwinkels und des Innenarms erforderte unterschiedliche Sätze von Parametern, um die jeweilige Hautbeschaffenheit zu beschreiben. Hierbei waren die relevanten Parameter des Innenarms solche, die primär Rauheitseigenschaften beschrieben, während die Parameter des Augenaußenwinkels primär die Art der Falten beschrieben. Letztere bilden in gewissem Sinne gröbere Eigenschaften ab als die Rauheitsparameter. Es ist durchaus denkbar, dass Unterschiede der Rauheit auch in den Augenaußenwinkeln vorhanden waren, jedoch durch die starke Ausprägung der Falten überdeckt wurden.

Die Rauheitsparameter des Innenarms sind in Tabelle 4.5 sowie im Anhang in Tabelle 7.1 aufgelistet und beschreiben mit einer Vielzahl von Messgrößen die Beschaffenheit der Spitzen- und Talflächen durch die Unterscheidung in Schiefe, Steilheit, Krümmung sowie die einzelnen Höhen und Tiefen bzw. Maximal- und Minimalpunkte. Die Hautparameter des Augenaußenwinkels, welche in Tabelle 4.4 aufgeführt sind, beschreiben im Detail die Beschaffenheit der einzelnen Falten, deren Volumen, Fläche und Anzahl. Darüber hinaus werden die Tiefen der einzelnen Falten näher charakterisiert. Die Definitionen aller Hautparameter, die im Anhang in Tabelle 7.1 dargestellt sind, zeigen auch, wie diese Hautparameter miteinander zusammenhängen, und erklären einen Teil der Korrelationen zwischen ihnen.

Die Fotos wurden ebenfalls nach standardisierten Kriterien erhoben und ausgewertet. Bemerkenswert erscheint die oben erwähnte Beziehung zwischen den Abdruckergebnissen des Innenarms und den nasolabialen Falten. Da im Prinzip auch die nasolabialen Falten externen Einflüssen ähnlich wie diejenigen des Auges ausgesetzt sein sollten, deutet der Unterschied des Ergebnisses zwischen beiden darauf hin, dass beim Auge zusätzliche externe Faktoren zum Tragen kommen oder die Geometrie des Augenaußenwinkels das Ergebnis verzerrt. Die Auswertung der Fotos

kann insofern als valide betrachtet werden, als die Übereinstimmung zwischen den drei Auswertern für ein visuelles Scoring-System relativ hoch war.

### 5.3 Hautalterung und Lungenfunktion

Die einzigen Lungenfunktionsmessgrößen, die in statistisch robuster Weise mit der Hautalterung korrelierten, fanden sich im Bereich der CO-Diffusionskapazität. Hierbei waren die Korrelationen mit der Hautbeschaffenheit des Innenarms für die gesamte Diffusionskapazität TLCO stärker als für den volumenbezogenen Transferkoeffizienten KCO. Dies könnte seine Ursache zum einen darin haben, dass in die TLCO auch die Lungengröße bzw. das alveoläre Volumen VA miteingehen und diese Größen gleichsinnig mit eingeschränkter Transportkapazität verändert waren. Dies würde bedeuten, dass der Transferkoeffizient KCO, als Quotient von TLCO und VA, weniger sensitiv als TLCO sein könnte. Darüber hinaus sind grundsätzliche Messprobleme bei der Bestimmung von VA in Betracht zu ziehen, die sich in den niedrigen Werten dieser Messgröße zeigten, wie auch in anderen Auswertungen von Daten aus COSYCONET zu ersehen ist.

Durch die Verwendung der aktuellen Sollwerte (GLI) wurden die Messwerte der Diffusionskapazität bereits in bestmöglicher Weise für Geschlecht, Alter und Größe adjustiert. Gleichwohl wurden in den Regressionsanalysen mit der Diffusionskapazität Geschlecht, Alter, BMI, Raucherstatus (derzeit ja/nein) sowie die vergangene Zigarettenrauchbelastung (Packyears) als mögliche Einflussvariablen mitgeführt, da auch die Hautbeschaffenheit von diesen Einflussgrößen abhängen könnte. Allerdings war keine dieser Kovariaten signifikant mit der Hautbeschaffenheit des Innenarms korreliert.

Gleichwohl schien der Einfluss des BMI, der bekanntermaßen mit dem Auftreten eines Lungenemphysems korreliert, sofern niedrige Werte vorliegen, ansatzweise vorhanden. Dies äußerte sich darin, dass in der Gruppe mit  $\text{BMI} \geq 25 \text{ kg/m}^2$  die Beziehungen zwischen dem Hautparameter Sp und TLCO trotz der kleineren Fallzahl signifikant blieben bzw. noch stärker ausgeprägt auftraten, während in der Gruppe mit  $\text{BMI} < 25 \text{ kg/m}^2$  keine Beziehung mehr zu erkennen war. Dies könnte darauf hindeuten, dass nur bei geringfügig oder stärker erhöhtem BMI die Hauttextur, die mit Alterung assoziiert ist, klar in Erscheinung trat, während bei normalem oder erniedrigtem

BMI z.B. eine Faltenbildung die Erkennung dieser Textur schwierig oder unmöglich macht. Diese Überlegung scheint plausibel, wurde allerdings bislang nicht durch Studien überprüft. Bemerkenswerterweise war der Bereich von TLCO-Werten, den die beiden Gruppen überdeckten, ähnlich, und insbesondere fanden sich auch in der Gruppe mit BMI  $\geq 25$  kg/m<sup>2</sup> Patienten mit niedriger Diffusionskapazität. Aus diesem Grunde entsprach die Bildung der beiden Gruppen nicht einer Auswahl bzgl. TLCO; wohl aber trat der Unterschied bezüglich des Hautparameters Sp zutage (siehe Abbildung 4.9).

Die Blutgasparameter, die für den Sauerstoffgehalt des Blutes eine Rolle spielten, waren ebenfalls mit Parametern der Hautalterung des Innenarms korreliert, doch verschwanden diese Korrelationen bzw. reduzierten sich nach Einbeziehung der Kovariaten. Auch hier erwies sich die Diffusionskapazität als überlegen. Dieses Ergebnis unterstreicht die Bedeutung der Einbeziehung von Kovariaten, auch wenn diese im Ergebnis zu einer konservativen Bewertung der Zusammenhänge führt. Eine konservative Bewertung scheint nicht zuletzt angesichts der Vielzahl der statistischen Vergleiche angemessen, um nicht falsch-positiven Bewertungen anheim zu fallen.

Interessanterweise wies unter den Komorbiditäten allein die Hyperlipidämie eine robuste Beziehung zum Hautparameter Ssk des Innenarms auf. Dieser Korrelation gemäß wäre in Gegenwart einer Hyperlipidämie das Tragverhalten der Haut geringer, jedenfalls bei Patienten mit COPD. Ein Mechanismus, der diesen Zusammenhang vermitteln könnte, ist nicht direkt ersichtlich. Der kausale Zusammenhang dürfte nicht primär über HDL bzw. LDL vermittelt werden, da diese Werte auch bei den Patienten mit der Diagnose einer Hyperlipidämie aufgrund einer entsprechenden Therapie zumeist normal waren. Nur bei insgesamt drei Patienten, davon zwei mit der Diagnose einer Hyperlipidämie, waren die Werte geringfügig erhöht.

Einen robusten Zusammenhang zu den Hautparametern des Augenaußenwinkels wies unter den Komorbiditäten die Hypertonie auf. Diese Korrelation war negativ und zeigte an, dass die Faltenlänge bei Vorliegen einer Hypertonie geringer war. Des Weiteren fanden sich positive Zusammenhänge zwischen den systolischen Blutdruckwerten sowie verschiedenen Parametern der Faltentiefe am Auge. Zwischen Patienten mit und ohne Diagnose einer Hypertonie bestanden keine Unterschiede des systolischen Blutdrucks. Möglicherweise deutet dieses widersprüchliche Ergeb-

nis darauf hin, dass die Anamnese einer Hypertonie, die bei vielen Patienten vorlag, nur ein Indikator eines anderen kausalen Effektes war. Gefäßänderungen, die mit der Entwicklung einer Hypertonie assoziiert sind, gelten oft auch als Zeichen einer Alterung. Ferner war der gemessene Blutdruck insofern von der Diagnose entkoppelt, als die Patienten mit der entsprechenden Diagnose in der Regel eine antihypertensive Therapie aufwiesen. In der Literatur liegen keine weiterführenden Daten vor, die, abgesehen von den allgemeinen Zusammenhängen zwischen kardiovaskulären Erkrankungen und Hautbeschaffenheit [Chan, 1990], den beobachteten Zusammenhang zwischen systolischem Blutdruck und Hautfalten erklären könnten.

## **5.4 Faktoren der biologischen Alterung**

Verschiedene Lungenerkrankungen wurden in der Vergangenheit zu vorgezogener Alterung in Beziehung gesetzt, darunter COPD, aber auch die Lungenfibrose [Renzone, 2014; Chilos, 2013; Karrasch et al., 2008]. Unter den Phänotypen der COPD scheint in dieser Hinsicht das Lungenemphysem von besonderem Interesse. In einer Reihe von Arbeiten wurden Änderungen an Zellen in der Lunge beobachtet, die mit der Hypothese einer vorzeitigen Alterung konform gehen [Holz et al., 2004; Spurzem & Rennard, 2005; Müller et al., 2006; Ansellem et al., 2011]. Änderungen im Sinne einer zellulären Seneszenz konnten auch durch Exposition von Lungenzellen gegenüber Zigarettenrauchextrakt bewirkt werden [Nyunoya et al. 2006; Deslee et al., 2010; De Ritis 2010; Schindler, 2015]. Dass Zigarettenrauchextrakt prinzipiell auch systemisch Wirkungen hervorrufen kann, wurde durch Untersuchungen an Adipozyten gezeigt [Machata, 2010; Heyne, 2011].

Auch für Herzkreislauferkrankungen, Nierenerkrankungen und eine Reihe anderer chronischer Erkrankungen wurden Zusammenhänge mit Alterung bzw. vorgezogener Alterung gezeigt [North & Sinclair, 2008; Klinkhammer et al., 2014]. Die Vielfalt der Beziehungen für verschiedene Organerkrankungen legt die Vermutung nahe, dass diese tatsächlich einen systemischen Aspekt aufweisen. Dieser Aspekt zeigt sich vor allem in einer Verkürzung der Telomeren von Leukozyten, wie in einer großen Zahl von Studien gezeigt [Epel et al., 2004; Brouillette et al., 2008; Weischer et al., 2014]. Dies ist auch bei der COPD der Fall [Tsuji et al., 2006; Savale et al., 2009; Ansellem et al., 2011]. In der vorliegenden Arbeit wurden die Telomerenlängen nicht bestimmt,

um den Patienten ein weiteres Blutentnahmeröhrchen zu ersparen. Versuchsweise wurden, ähnlich wie für das Peptid LL-37, Daten aus einer vorangegangenen Doktorarbeit [Lucke, 2015] bei den gleichen Patienten übernommen; allerdings wurden diese Daten bei den Visiten V1 bis V3 gewonnen, verglichen mit V4 und V5 in dieser Studie, und waren daher nicht auf den aktuellen Zustand des Patienten bezogen. Der Hauptgrund dafür, in der gegenwärtigen Studie keine Korrelationen mit der Telomerenlänge beobachtet zu haben, dürfte allerdings darin liegen, dass erfahrungsgemäß für diesen wissenschaftlich wertvollen, jedoch relativ unspezifischen Marker größere Fallzahlen als in der vorliegenden Studie benötigt werden. Aus diesem Grunde lag in dieser Arbeit der Fokus darauf, die Genexpressionen eines Panels von molekularen Markern zu bestimmen, die möglicherweise spezifischer als Telomeren mit Alterungsprozessen zusammenhängen, vor allem solchen der COPD.

In der vorliegenden Arbeit war es nicht möglich, zelluläre Proben aus dem Atemtrakt oder der Haut zu entnehmen, um sie auf eventuelle Zeichen einer Alterung zu untersuchen. Bei einer systemischen Vermittlung von Änderungen, die an Lunge und Haut auftreten, wären entsprechende Veränderungen an Blutzellen, d.h. einem sozusagen intermediärem Organ, nicht unplausibel. Ferner wurden bei Patienten mit COPD und Rauchern bereits verkürzte Telomeren nachgewiesen [Morlá et al., 2006; Savale et al., 2009]. Dies war der Grund, warum in der vorliegenden Arbeit die Genexpression dieser Zellen untersucht wurde. Einschränkend ist zu bemerken, dass die RNA der gesamten Leukozyten zur Analyse herangezogen wurde und insofern keine Differenzierung zwischen verschiedenen Zelltypen möglich war.

Zwischen einigen Parametern des Innenarms und der Konzentration von CRP im Blut fanden sich robuste Zusammenhänge. Diese sind am ehesten so zu interpretieren, dass eine chronische Entzündung eine Alterung begünstigen kann. In Ermangelung weiterer Entzündungsmarker wurde diese Frage in der vorliegenden Arbeit nicht weiter verfolgt.

## **5.5 Genexpressionen potentieller Alterungsmarker**

Die Anzahl der Leukozyten pro Volumen war mit der Expression von SOD2 und STAT3 schwach negativ korreliert, während STAT3 und SOD stark positiv miteinander korreliert waren. Die Daten bzgl. SOD2 lassen sich möglicherweise im Sinne ei-

ner reduzierten anti-oxidativen Abwehr bei höherem Grad an Entzündung interpretieren. Hinsichtlich des CRPs sind die Korrelationen mit Vorsicht zu bewerten, da sie durch einige extreme Werte beeinflusst waren; dieser Effekt konnte auch durch eine logarithmische Transformation nicht vollständig eliminiert werden.

Interessanterweise waren die Lungenfunktionsparameter mit anderen molekularen Markern assoziiert als die Leukozyten und das CRP. Hierbei erschien die signifikante Beziehung zwischen der Expression von p21 und dem errechneten Emphysemscore besonders bemerkenswert; dies ist interessant unter dem Aspekt der Lungenalterung. Die Beobachtung geht konform mit Daten, die an Zellkulturen gewonnen wurden und bei denen eine vermehrte Expression von p21 an Epithel- und Endothelzellen der Lunge von Patienten mit Emphysem gefunden wurde [Ansellem et al., 2011]. In dieser Untersuchung wurden auch Beziehungen zur Telomerenlänge gefunden. Eine Erhöhung von p21 bei COPD-Patienten wurde bereits vorher berichtet [Rutten et al., 2016].

In einer weiteren Studie [Nyonoya et al., 2009] konnte gezeigt werden, dass in der Zellkultur Zigarettenrauch zu einer Herunterregulierung des Werner Proteins WRN und somit zu einer vorzeitigen Seneszenz führte. Dass dieser beschleunigte Alterungsprozess und eine damit vermutlich verbundene Entwicklung eines Emphysems jedoch komplex und noch andere Signalwege an diesem Prozess beteiligt sind, wurde durch die Daten eines Tiermodells nahegelegt [Rashid et al., 2018], in dem gezeigt wurde, dass Alterung und zelluläre Seneszenz auf molekularer Ebene nicht gleichzusetzen sind. Gleichwohl fand sich in der vorliegenden Studie ein signifikanter Zusammenhang zwischen der Expression von WRN und der Hautalterung am Innenarm. WRN war nur tendenziell mit den Ergebnissen der Fotos korreliert. Möglicherweise ist die Haut ein besserer Indikator von Alterung als die Lunge, insofern als die Lunge zusätzlich von Entzündungsprozessen beeinflusst werden kann. Dies würde das Fehlen einer Korrelation zwischen der Expression von WRN in Blutzellen und den Werten der Lungenfunktion erklären.

Ferner belegen Daten [Matsuyama et al., 2016], dass ein Fehlen des Reparaturgens XRCC6 (Ku70) zu vorzeitiger Alterung und der Entstehung eines Lungenemphysems führen kann. In der vorliegenden Studie fand sich für den Hautparameter S am Innenarm eine positive Korrelation mit der Expression von XRCC6, neben der Korrelation mit WRN. Der Parameter S gibt den mittleren Abstand der Profilspitzen im Rau-

heitsprofil an, und bei stärkerer Alterung wäre am ehesten ein kleinerer Abstand zu erwarten. Die beobachteten positiven Korrelationen dieses Parameters mit WRN und XRCC6 bestätigen die Vermutung, dass sowohl das Werner-Protein als auch das für die DNA-Reparatur mitverantwortliche Protein Ku70 einen protektiven Einfluss auf den endogenen Alterungsprozess der Haut ausüben.

Unter den anthropometrischen Parametern wies der BMI Zusammenhänge zu SIRT1, TERF2 und VEGFB auf; hierunter erschien vor allem die Beziehung zu SIRT1 von Interesse. Eine Beziehung zwischen SIRT1 und Änderungen des Körpergewichts wurde bereits in einer früheren Untersuchung gezeigt [Crujeiras et al., 2008]. Sirtuine, vor allem SIRT1, spielen eine zentrale Rolle für Langlebigkeit und zelluläre Seneszenz, wie für viele Organismen gezeigt wurde [Rajendrasozhan et al. 2008; Karrasch et al., 2008]. Dies wird über verschiedene Signalwege erreicht. Über PPAR- $\gamma$  reguliert SIRT1 die Adipogenese und Lipolyse mit. Als multifunktionale Proteindeacetylase ist SIRT1 an der Aktivierung verschiedener Gene beteiligt. So spielt SIRT1 mittels p53 eine Rolle beim Überleben im Stress. Die Deacetylierung des DNA-Reparaturfaktors Ku70 hemmt die Bax-medierte Apoptose und führt so zum Langzeit-Überleben unersetzlicher post-mitotischer Zellen. Des Weiteren moduliert die Proteindeacetylase SIRT1 auch den Transkriptionsfaktor NF- $\kappa$ B, ferner die Transkriptionsfaktoren FOXO1, FOXO3 sowie FOXO4, welche den Zelltod bei gleichzeitiger Hochregulierung von Antioxidantien verhindern. Somit gibt es viele Signalwege, über die SIRT1 aktiv werden kann und möglicherweise eine induzierte Alterung beeinflusst.

Der Zusammenhang zwischen Rauchen und SIRT1 wurde in Zellkultur untersucht [Rajendrasozhan et al. 2008], mit dem Ergebnis, dass Zigarettenrauchextrakt die Expression von SIRT1 verminderte. Entsprechend war die Konzentration von SIRT1 in den Lungen von COPD-Patienten reduziert, einhergehend mit einer Addukt-Bildung von SIRT1 durch oxidativen Stress. Die Effekte fanden sich bereits bei Rauchern, traten aber bei COPD-Patienten verstärkt auf. Umgekehrt konnte im Tiermodell bei Exposition von Mäusen gegenüber Zigarettenrauch gezeigt werden [Yao et al., 2012], dass die Expression von SIRT1 im Lungengewebe via FOXO3 zur Reduktion einer vorzeitigen Seneszenz und zum Schutz vor einem Lungenemphysem führte.



In der vorliegenden Studie fanden sich keine Zusammenhänge zwischen der Lungenfunktion und der Expression von SIRT1 in Zellen des peripheren Blutes, wohl aber ein positiver Zusammenhang mit dem BMI. Patienten mit einem Emphysem und möglicherweise Defekten in SIRT1 in der Lunge [Rajeendrasozhan et al. 2008] weisen oft erniedrigte BMI-Werte auf, insofern sind die Daten konsistent mit den Literaturdaten. Eine weitere Studie konnte allerdings aufzeigen, dass bei Atemwegsge-sunden die Expression von SIRT1 und SIRT2 durch die Kalorienzufuhr beeinflusst wurde, indem eine Kalorienrestriktion und dadurch induzierte Gewichtsabnahme zur vermehrten Expression führte [Crujeiras et al., 2008]. Allerdings mögen sich diese Bedingungen von denen einer stabilen COPD unterscheiden, zumal bekannt ist, dass die Expression von SIRT1 über NAD durch eine reduzierte Kalorienzufuhr erhöht werden kann, ein Mechanismus, der beim Tier wesentlich zur Langlebigkeit beiträgt [Karrasch et al., 2008]. Vermutlich dominiert in der Lunge der schädigende Einfluss von Zigarettenrauch und Entzündung auf SIRT1, und dieser Zusammenhang setzt sich systemisch fort.

Zahlreiche Daten weisen darauf hin, dass auch die Lungengefäße an der Genese chronischer Lungenerkrankungen beteiligt sind und vor allem der Untergang von Endothelzellen als Pathomechanismus bei der Entstehung eines Emphysems involviert ist. Die Präsenz und Funktionsfähigkeit der Blutgefäße werden vor allem durch den Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF) beeinflusst, welcher im Lungengewebe von Patienten mit Emphysem verändert ist. Besonders die hypoxische Vasokonstriktion wurde als wichtiger Faktor bei der Umorganisation des Lungengewebes identifiziert [Voelkel et al., 2011]. Obwohl in der gegenwärtigen Studie keine direkte Korrelation zwischen VEGFB und der Diffusionskapazität für CO, als besonders gutem Marker eines Emphysems, zutage trat, zeigte sich ein positiver Zusammenhang zwischen der Expression von VEGFB und dem Knöchel-Arm-Index (ABI), der als Indikator für den Gefäßstatus herangezogen wurde.

In verschiedenen Arbeiten [Valipur et al., 2008; Tabara et al., 2014] wurden signifikante Beziehungen zwischen VEGF und FEV<sub>1</sub> gefunden. FEV<sub>1</sub> dient zur Einteilung der COPD in Schweregrade der Erkrankung, bildet jedoch primär die Obstruktion der Atemwege, nicht jedoch die Gasaufnahmekapazität ab. Umgekehrt konnte gezeigt werden [Houben-Wilke et al., 2017], dass signifikante Korrelationen zwischen dem so definierten Schweregrad der COPD und dem Knöchel-Arm-Index bestehen. Diese

Beobachtungen legen den Schluss nahe, dass zwischen VEGF und ABI ein Zusammenhang bestehen sollte, wie in dieser Arbeit gefunden. Eine mögliche Korrelation mit der Diffusionskapazität und VEGF wurde in den genannten Untersuchungen nicht näher analysiert. Dies wäre wünschenswert gewesen, da nach den hier gezeigten Daten Beziehungen der verschiedenen Biomarker zu TLCO bzw. KCO, nicht aber FEV<sub>1</sub> bestanden. Bezüglich der Komorbiditäten bestanden keine Korrelationen, vermutlich wegen zu geringer Fallzahlen der einzelnen Komorbiditäten, vor allem aber, da die verschiedenen Komorbiditäten die molekularen Marker in unterschiedlicher Weise beeinflussen. Möglicherweise wäre hierfür auch eine Analyse der einzelnen Zellpopulationen der Leukozyten erforderlich gewesen.

## 5.6 Limitationen der Arbeit

Aufgrund der über die Zeit stark geschrumpften Fallzahlen der Patienten von COSYCONET in der Subkohorte „Klinikum Innenstadt der LMU“ standen für die Messungen, Probenahmen und Analysen weniger als 50 Patienten zur Verfügung. Dadurch war die statistische Test-stärke (Power) stärker begrenzt als dies bei einer vorangegangenen Studie an dieser Subkohorte [Lucke, 2015] der Fall war. Gleichwohl konnten statistisch robuste Beziehungen sowohl mit Hautmarkern als auch mit molekularen Markern gefunden werden. Da im Rahmen von COSYCONET eine ganze Reihe von Blutproben entnommen werden, war die Anzahl der Proben, die für die vorliegende Untersuchung zusätzlich genommen werden konnten, auf eine Probe limitiert. Aus diesem Grunde war es nicht möglich, Blutproben eines Umfangs zu entnehmen, der eine Genexpressionsanalyse in verschiedenen Zelltypen erlaubt hätte. In ähnlicher Weise war auch die Zeit limitiert, innerhalb derer Hautabdrücke genommen und Fotos erstellt werden konnten. Unter anderem aus diesem Grunde war es nicht möglich, verschiedene Stellen des Körpers zu untersuchen, unter denen Rücken und Gesäß von besonderem Interesse gewesen wären. Umso bemerkenswerter ist es, dass mit der begrenzten Zahl von Patienten dennoch verlässliche und aufschlussreiche Befunde gewonnen werden konnten.

## 5.7 Schlussfolgerung der Arbeit

Als Hauptergebnis der vorliegenden Arbeit ist der Zusammenhang zwischen Hautparametern des Innenarms, die das Ausmaß einer Alterung erfassen, und Einschränkungen der Diffusionskapazität zu nennen, die als Indikator eines Emphysems gelten können. Ebenfalls ergaben sich Beziehungen zu der Faltentiefe im Gesicht, die anhand von Fotos ausgewertet wurde; jedoch schienen diese Beziehungen weniger robust als die des Innenarms zur gesamten Diffusionskapazität TLCO, die sowohl die Effekte von schlechter Belüftung als auch reduziertem Kapillarbett beim Lungenemphysem beschreibt. Somit scheint die quantitative Erfassung der Hautalterung per Abdruck die systemischen Alterungsprozesse bei COPD-Patienten gut zu erfassen. Die Alternative ist die semiquantitative Abschätzung der Alterung per Fotoaufnahmen, die allerdings aufgrund der Notwendigkeit multipler Auswerter ebenfalls aufwendig ist. Ferner ist der Zusammenhang zwischen dem errechneten Emphysemscore und der Expression des Zellzyklusregulators p21 in Blutzellen zu nennen. Die Plausibilität der Ergebnisse wird durch die Korrelation zwischen dem Gefäßstatus (Knöchel-Arm-Index ABI) und der Expression des Wachstumsfaktors für Blutgefäße, VEGFB, unterstrichen. Somit stützt die vorliegende Arbeit trotz der relativ geringen Fallzahl der Patienten, die Hypothese einer vorzeitigen, durch Zigarettenrauchen induzierten, systemischen biologischen Alterung. Zugleich legen die Ergebnisse in Hinblick auf den BMI nahe, dass bei der Beurteilung der Hautalterung Patienten mit (leicht) erhöhtem BMI eine bessere Erkennung zulassen als solche mit normalem oder reduziertem BMI.

## 5.8 Ausblick

Im Vergleich zu den Fotos erwiesen sich die Hautabdrücke des Innenarms als aussagekräftiger, was eine Beziehung zu Diffusionskapazität anbelangte. Allerdings war auch der Aufwand sowohl für die Messung als auch für die Auswertung höher. Darüber hinaus wäre es wünschenswert, in künftigen Untersuchungen nicht allein die Lungenfunktionsparameter auszuwerten, sondern die Befunde einzubeziehen, die aus einem CT des Thorax oder wenigstens einer Röntgenaufnahme abgeleitet werden können im Hinblick auf das Vorhandensein und die Ausprägung eines Lungenemphysems. Die Hypothese, dass die Entwicklung eines Emphysems mit einer induzierten, vorgezogenen Alterung einhergeht, wurde vor mehr als 15 Jahren publiziert [Holz et al., 2004]. In der Zwischenzeit wurden zwar viele Daten zu diesem Thema erhoben, viele davon jedoch nicht am Patienten, sondern in Zellkultur oder in Tiermodellen, deren Übertragbarkeit auf den Menschen nicht immer klar ist. Dies liegt möglicherweise daran, dass außer der Telomerenlänge von Leukozyten des Blutes keine anderen etablierten Marker einer systemischen Alterung verfügbar sind. Im Lichte dieser Tatsachen könnte man die vorgestellten Daten dahin interpretieren, dass die durch Abgüsse quantitativ charakterisierte Hautbeschaffenheit geeigneter Stellen des Körpers, z.B. des Innenarms, einen brauchbaren, vielleicht sogar den besten allgemeinen Marker für eine systemisch vermittelte Alterung darstellt. Standardisierte Fotos wären eine mögliche Alternative. In der Zwischenzeit sind Geräte auf dem Markt verfügbar, welche die Hautbeschaffenheit direkt, d.h. ohne den Umweg über Abgüsse oder Fotos erfassen können.

## 6 Zusammenfassung

Seit geraumer Zeit gibt es Daten, die einen Zusammenhang zwischen vorzeitiger Alterung und chronischen Erkrankungen einschließlich der chronisch-obstruktiven Lungenerkrankung (COPD) belegen [Karrasch et al., 2008; North & Sinclair, 2008; Chilosi, 2013; Renzoni, 2014; Lucke, 2015]. Die meisten Daten wurden allerdings an Tier- und Zellkulturmodellen erhoben, und nur wenige Arbeiten haben diese Zusammenhänge unmittelbar am Menschen untersucht. Dementsprechend ist die Frage ungeklärt, welche Marker am besten für die Bestimmung einer vorzeitigen Alterung unter klinischem Aspekt geeignet sind. Der einzige Marker, der zumindest in der Forschung einigermaßen etabliert, allerdings relativ unspezifisch ist und nur begrenzte Aussagekraft hat, ist die Telomerenlänge von Blutleukozyten. Aus einigen wenigen Studien ergaben sich ferner Hinweise darauf, dass auch die Hautbeschaffenheit ein Marker für vorzeitige Alterung sein könnte; diese wurde anhand der Ausprägung von Falten mittels Fotoaufnahmen des Gesichts untersucht.

In der vorliegenden Arbeit wurde zum einen eruiert, ob über eine visuelle Bewertung hinaus eine quantitative Auswertung der Hautstruktur Aussagen erlaubt, insbesondere solche, die mit einem Lungenemphysem bzw. Markern eines Lungenemphysems in Zusammenhang stehen. Daher wurden zusätzlich zu Fotoaufnahmen des Gesichts auch Abdrücke vom Augenaußenwinkel angefertigt. In der Hautstruktur des Augenaußenwinkels sollten sich die Effekte sowohl einer endogenen als auch einer exogenen Alterung widerspiegeln, vor allem auf Basis einer UV- und Zigarettenrauch-Exposition. Zum Vergleich wurden Abdrücke vom Innenarm genommen, unter der Hypothese, ein in geringerem Maße einer Sonnen- und Zigarettenrauch-Exposition ausgesetztes Areal zu messen und somit zwischen endogener und exogener Hautalterung unterscheiden zu können. Die Hypothese war, dass vornehmlich die Parameter des Innenarms mit der Lungenfunktion korrelieren sollten.

Zum anderen war die Hypothese, dass sich eine biologische Alterung auch auf molekularer Ebene bemerkbar machen und, sofern sie einen systemischen Charakter hat, in der Expression relevanter Gene in Blutzellen widerspiegeln sollte. Hierzu wurde ein Satz von Genen identifiziert, die im Zusammenhang mit einer vorzeitigen Alterung stehen könnten. Diese Gene umfassten ATM, CAT, CDKN1A, FOXO1, Klotho, LMNA, SIRT2, SOD, STAT, VEGFB, WRN, XRCC5 und XRCC6. Die zentrale Frage,

ob die Marker der Hautbeschaffenheit und der Genexpression mit der Ausprägung einer COPD, insbesondere eines Lungenemphysems, zusammenhängen, wurde vor allem anhand der Diffusionskapazität für Kohlenmonoxid untersucht, die als bester Marker für ein Lungenemphysem bekannt ist.

In die vorliegende Studie wurden 46 Patienten des Studienzentrums LMU München eingeschlossen, die an der deutschlandweiten COPD-Studie COSYCONET teilnahmen. Die Untersuchungen erfolgten im Rahmen der Visiten 4 und 5. Zusätzlich zu den umfangreichen, innerhalb von COSYCONET durchgeführten Messungen erfolgten spezielle Untersuchungen, um die beschriebenen Marker einer Alterung zu erfassen. Hierzu wurden Fotoaufnahmen des Gesichts sowie Hautabdrücke vom Augenaußenwinkel und von der Innenseite des Unterarms angefertigt. Des Weiteren erfolgte eine Blutentnahme zwecks Expressionsanalyse verschiedener Gene, die im Zusammenhang mit einer vorzeitigen Alterung stehen könnten. Die Expression der Gene wurde mithilfe einer quantitativen PCR erfasst, die zu dem Zweck der Studie eigens aufgebaut und optimiert wurde.

Unter den Patienten befanden sich 24 (52,2%) Frauen und 22 (47,8%) Männer, mit einem mittleren ( $\pm$ SD) Alter von  $69\pm 8$  Jahren. Hinsichtlich der spirometrischen COPD-Schweregrade befanden sich 8 (17,4%) Patienten im Stadium GOLD 1, 20 (43,5%) in GOLD 2, 16 (34,8%) in GOLD 3 und 2 (4,3%) in GOLD 4. Ferner befanden sich 25 (54,4%) Patienten in der Gruppe GOLD A, 10 (21,7%) in GOLD B, 5 (10,9%) in GOLD C, sowie 6 (13,0%) in GOLD D. In dieser Hinsicht entsprachen die Patienten einem typischen Studienkollektiv von COPD-Patienten. Entsprechend zeigten die Patienten die für ein solches Kollektiv typischen Veränderungen der Lungenfunktion, sowohl in den spirometrischen und ganzkörperplethysmographischen Messgrößen als auch in der Diffusionskapazität der Lunge für Kohlenmonoxid, TLCO, sowie dem volumenbezogenen Transferkoeffizienten, KCO.

Als Hauptergebnis fanden sich Zusammenhänge zwischen Hautparametern des Innenarms und TLCO, welche auch nach Adjustierung für potenziell relevante andere Einflussgrößen (Geschlecht, Alter, BMI, Raucherstatus (derzeit ja/nein), Packyears) erhalten blieben und somit robust waren. Dies galt vor allem für den Hautparameter Sp, der die Höhe der größten Profilspitze innerhalb der Gesamtmessfläche und somit die Rauigkeit der Haut beschreibt. Für KCO zeigte sich ein ähnliches Ergebnis, wenngleich die Beziehungen nur an der Grenze zur Signifikanz lagen, als Hinweis

darauf, dass der kombinierte Effekt von Transportstörung und Verringerung des für den Gastransport zugänglichen Volumens, wie er durch TLCO beschrieben wird, am besten das Ausmaß einer biologischen Alterung der Lunge charakterisiert. Der BMI spielte insofern eine Rolle, als bei Patienten mit  $\text{BMI} \geq 25 \text{ kg/m}^2$  die Beziehungen zwischen Sp und TLCO trotz der kleineren Fallzahl signifikant blieb bzw. noch stärker ausgeprägt war, als Hinweis darauf, dass ein größerer BMI die alterungsassoziierte Hauttextur in der quantitativen Analyse besonders gut hervortreten ließ.

Weitere Korrelationen mit der Hautbeschaffenheit des Innenarms zeigten sich für Blutgasparameter und das C-reaktive Protein CRP, allerdings waren diese Beziehungen nicht alle statistisch robust gegenüber der Einbeziehung der anthropometrischen Charakteristika und des Rauchverhaltens. Bezüglich der Komorbiditäten zeigte sich ein robuster Zusammenhang zwischen der Hyperlipidämie und dem Hautparameter Ssk, welcher das Tragverhalten der Hautstruktur beschreibt. Für die Hautbeschaffenheit des Augenaußenwinkels fanden sich keine Beziehungen zu den Lungenfunktionsparametern, wohl aber zur Anzahl der Leukozyten und den systolischen Blutdruckwerten, diese Beziehungen erwiesen sich allerdings nicht als robust nach Einführung der genannten Kovariaten. Unter den Komorbiditäten fanden sich statistisch signifikante Beziehungen von gastrointestinalen Erkrankungen, koronarer Herzkrankung sowie Bluthochdruck zu verschiedenen Parametern des Augenaußenwinkels. Als statistisch robust stellte sich allerdings nur die Korrelation zwischen Faltenlänge und Bluthochdruck heraus.

Die molekularen Marker ließen sich in vier Gruppen aufteilen, wobei die Marker innerhalb der Gruppen gut miteinander korrelierten, während die Gruppen miteinander eine geringe Korrelation zeigten. Daher konnten die weiteren Analysen der Übersichtlichkeit halber mit jeweiligen Repräsentanten der Gruppen erfolgen, wenngleich auch alle einzelnen Beziehungen überprüft wurden. Hinsichtlich der Lungenfunktionsparameter zeigten sich signifikante und robuste Zusammenhänge zwischen der Expression des Zellzyklusregulators p21 und einem errechneten, funktionellen Emphysemscore, der als wesentlichen Teilfaktor die Diffusionskapazität enthielt. Dieses Ergebnis ist insofern interessant, als in der Literatur eine vermehrte Expression von p21 an Lungenzellen von Patienten mit Emphysem berichtet wurde. Bezüglich der Hautalterung zeigten sich Korrelationen zwischen Hautparametern des Innenarms und dem für Alterung relevanten Werner-Protein WRN sowie dem DNA-

Reparaturgen Ku70 (XRCC6). Unter den anthropometrischen Parametern zeigten sich robuste Beziehungen zwischen BMI und der für Regeneration und Alterung relevanten Deacytelase SIRT1, dem für den Schutz der Telomeren relevanten Protein TERF und dem für die Bildung von Blutgefäßen bedeutenden Wachstumsfaktor VEGFB. VEGFB zeigte des Weiteren eine Korrelation zum Gefäßstatus (Knöchel-Arm-Index), die plausibel erscheint und die Validität der Messungen bestätigt.

Eine Analyse der Fotos, deren Ergebnis als Mittelwert der Score-Werte von drei Auswertern analysiert wurde, ergab robuste Korrelationen der nasolabialen Falten mit der Diffusionskapazität der Lunge, ebenfalls Korrelationen mit der Expression von SOD2 und STAT3. Insgesamt korrelierten die periorbitalen Falten mit den Charakteristika der Hautabdrücke des Augenaußenwinkels, und die nasolabialen Falten mit den Parametern der Abdrücke des Innenarms. Diese Beobachtung unterstrich die Validität der Ergebnisse.

Somit war das Hauptergebnis der vorliegenden Arbeit, einen Zusammenhang zwischen Hautparametern des Innenarms sowie nasolabialen Falten, die das Ausmaß einer Alterung erfassen, und Einschränkungen der Diffusionskapazität, die als Indikator eines Emphysems gelten können, gezeigt zu haben. Demgegenüber war die Analyse periorbitaler Falten unterlegen. Die quantitative Erfassung der Hautalterung per Abdruck schien die systemischen Alterungsprozesse bei COPD-Patienten besonders gut zu erfassen, wie sich an einer ganzen Anzahl an Parametern zeigte. Als weiteres bemerkenswertes Ergebnis ist der Zusammenhang zwischen einem funktionellen Emphysemscore der Lunge und der Expression des Zellzyklusregulators p21 in Blutzellen zu nennen. Die Plausibilität der Beobachtungen wird durch die Korrelation zwischen dem Gefäßstatus und der Expression des zentralen Wachstumsfaktors für Blutgefäße, VEGF, unterstrichen. Somit untermauert die vorliegende Arbeit die Hypothese einer vorzeitigen, durch Zigarettenrauchen induzierten, systemischen biologischen Alterung. Zugleich legen die Ergebnisse hinsichtlich der Abhängigkeit vom BMI nahe, dass bei der Beurteilung der Hautalterung Patienten mit (leicht) erhöhtem BMI eine bessere Erkennung zulassen als solche mit normalem oder reduziertem BMI.



## 7 Anhang

### 7.1 Auszug aus Handbuch GFMesstechnik

Handbuch PRIMOS



#### Beschreibung der Kennwerte:

Name	Abkürzung	Beschreibung
Arithmetischer Rauhwert	Sa	<p>Sa ist der arithmetische Mittelwert der Beträge der Profilwerte des Rauheitsprofils.</p> <p>Sa ist eine Senkrechtkenngröße, d. h. sie beschreibt die Rauheit in senkrechter Richtung.</p> $Sa = \frac{1}{nx * ny} * \sum_{i=1}^{nx} \sum_{j=1}^{ny} R(x_i, y_j)$
Quadratischer Rauhwert	Sq	<p>Sq ist der quadratische Mittelwert der Profilwerte des Rauheitsprofils. Wird mehr als eine Einzelmessfläche eingestellt, so ist Sq der Mittelwert von den Einzelmessflächen.</p> <p>Sq ist eine Senkrechtkenngröße, d. h. sie beschreibt die Rauheit in senkrechter Richtung.</p> $Sq = \sqrt{\frac{1}{nx * ny} * \sum_{i=1}^{nx} \sum_{j=1}^{ny} R^2(x_i, y_j)}$
Maximale Ausdehnung des Rauheitsprofils	Smax	<p>Dieses ist die Höhendifferenz von der höchsten Spitze zum tiefsten Tal innerhalb der Gesamtmessfläche.</p> <p>Smax ist eine Senkrechtkenngröße.</p>
Zehnpunktehöhe	Sz	<p>Sz ist der Mittelwert der Beträge der 5 höchsten Spitzen und der 5 tiefsten Täler von der Gesamtmessfläche.</p> <p>Sz ist eine Senkrechtkenngröße, d. h. sie beschreibt die Rauheit in senkrechter Richtung.</p> $Sz = \frac{\sum_{i=1}^5  Rp_i  + \sum_{i=1}^5  Rv_i }{10}$
Größte Rauhtiefe von den Einzelmessflächen	St	<p>St ist der größte Höhenunterschied innerhalb einer Einzelmessfläche. Ist die Einzelmessflächenanzahl gleich 1, so ist St = Stm = Smax.</p> <p>St ist eine Senkrechtkenngröße.</p>
Gemittelte Rauhtiefe von den Einzelmessflächen	Stm	<p>Bei der Berechnung von Stm wird von jeder Einzelmessfläche die Differenz vom Maximum zum Minimum gebildet. Diese werden aufaddiert und durch die Anzahl der Einzelmessflächen geteilt.</p> <p>Stm ist eine Senkrechtkenngröße, d. h. sie beschreibt die Rauheit in senkrechter Richtung.</p>
Höhe der größten Profilspitze	Sp	<p>Sp ist die Höhe der größten Profilspitze innerhalb der Gesamtmessfläche.</p> <p>Sp ist eine Senkrechtkenngröße.</p>

Name	Abkürzung	Beschreibung
Mittelwert der Höhe der Profilspitzen	Spm	Spm ist der arithmetische Mittelwert der höchsten Profilspitze innerhalb einer Einzelmessfläche über alle Einzelmessflächen. Spm ist eine Senkrechtkenngroße, d. h. sie beschreibt die Rauheit in senkrechter Richtung.
Tiefe des größten Profiltals	Sv	Sv ist die Tiefe des größten Profiltals innerhalb der Gesamtmessfläche.  Sv ist eine Senkrechtkenngroße.
Mittelwert der Tiefen der Profiltäler	Svm	Svm ist der arithmetische Mittelwert des tiefsten Profiltals innerhalb einer Einzelmessfläche über alle Einzelmessflächen. Svm ist eine Senkrechtkenngroße, d. h. sie beschreibt die Rauheit in senkrechter Richtung.
Schiefe (Skewness)	Ssk	Ssk ist ein Maß für die Asymmetrie der Amplitudendichtekurve. Eine negative Schiefe kennzeichnet eine Oberfläche mit gutem Tragverhalten. Für normal verteilte Profilwerte ist Ssk = 0.  Ssk ist eine Senkrechtkenngroße, d. h. sie beschreibt die Rauheit in senkrechter Richtung.  $Ssk = \frac{1}{nx * ny * Sq^3} * \sum_{i=1}^{nx} \sum_{j=1}^{ny} R^3(x_i, y_j)$
Steilheit (Kurtosis)	Sku	Sku ist ein Maß für die Steilheit der Amplitudendichtekurve. Für normal verteilte Profilwerte ist Sku = 3.  Sku ist eine Senkrechtkenngroße, d. h. sie beschreibt die Rauheit in senkrechter Richtung.  $Sku = \frac{1}{nx * ny * Sq^4} * \sum_{i=1}^{nx} \sum_{j=1}^{ny} R^4(x_i, y_j)$
Mittlerer Abstand der Profilspitzen	S	S gibt den mittleren Abstand der Profilspitzen im Rauheitsprofil an. Die Mindesthöhe für eine Spitze ist der Wert 0. Bei den Einstellungen kann noch eine Zählschwelle in waagerechter Richtung definiert werden.. S ist eine Waagerechtkenngroße.
Arithmetischer Mittelwert der Profilsteigung des Rauheitsprofils	Sda	Sda ist der arithmetische Mittelwert der örtlichen Profilsteigungen in x- und y-Richtung. Sda ist eine gemischte Kenngröße, d. h. sie beschreibt die Rauheit in senkrechter und waagerechter Richtung.
Quadratischer Mittelwert der Profilsteigung des Rauheitsprofils	Sdq	Sdq ist der quadratische Mittelwert der örtlichen Profilsteigungen in x- und y-Richtung. Sdq ist eine gemischte Kenngröße, d. h. sie beschreibt die Rauheit in senkrechter und waagerechter Richtung.

Name	Abkürzung	Beschreibung
	Sl <sub>a</sub>	Sl <sub>a</sub> wird von Sd <sub>a</sub> abgeleitet und berechnet sich nach untenstehender Formel. $Sl_a = 2 * \pi * \left( \frac{S_a}{S_{da}} \right)$
	Sl <sub>q</sub>	Sl <sub>q</sub> wird von Sd <sub>q</sub> abgeleitet und berechnet sich nach untenstehender Formel. $Sl_q = 2 * \pi * \left( \frac{S_q}{S_{dq}} \right)$
Spitzenanzahl	PC	PC ist die Anzahl der Spitzen in der Gesamtmessstrecke. Für diesen Parameter gibt es einen Einstellparameter, welche unter der Beschreibung der Fensterelemente weiter oben im Text aufgeführt sind.
Flächenüberschuss der gekrümmten Oberfläche	Sdr	Sdr ist der Überschuss der gekrümmten Oberfläche zur ebenen Auswertefläche. Dieser Wert ist in Prozent angegeben. Sdr ist eine Senkrechtengröße, d. h. sie beschreibt die Rauheit in senkrechter Richtung. $Sdr = \frac{A_o - A_e}{A_e} * 100\%$
Tiefe des Rauheitskerns	Sk	Sk ist die Höhendifferenz zwischen den Materialanteilen Mr1 und Mr2.
Reduzierte Spitzenhöhe	Spk	Spk ist die mittlere Höhe der herausragenden Spitzen, welche über dem Materialanteil Mr1 liegen.
Reduzierte Riefentiefe	Svk	Svk ist die mittlere Tiefe der Täler, welche unter dem Materialanteil Mr2 liegen.
Materialgefüllte Spitzenfläche	V1	V1 wird nach untenstehender Formel berechnet. Nach der untenstehenden Formel ergibt sich noch keine Fläche, um die Fläche zu erhalten muss der berechnete Wert mit der Gesamtmessfläche multipliziert werden. $V1 = \frac{1}{2} * Rpk * Mr1$
Leere Talfläche	V2	V2 wird nach untenstehender Formel berechnet. Nach der untenstehenden Formel ergibt sich noch keine Fläche, um die Fläche zu erhalten muss der berechnete Wert mit der Gesamtmessfläche multipliziert werden. $V2 = \frac{1}{2} * Rvk * (100 - Mr2)$

Erläuterung zu den verwendeten Abkürzungen:

nx = Anzahl der Punkte des Auswerterechteckes in x-Richtung

**Tabelle 7.1:** Beschreibung der Parameter der Hautabdrücke, übernommen aus Handbuch Primos (GFMesstechnik)

## 7.2 Produktanwendung RNA-Isolierung, Promega



### Product Application

#### Total RNA isolation from blood collected in PAXgene™ Blood RNA Tubes with the Maxwell® RSC miRNA Tissue Kit.

*To isolate total RNA including miRNAs from blood collected in PAXgene™ Blood RNA Tubes.*

<b>Kit:</b>	Maxwell® RSC miRNA Tissue Kit (AS1460)
<b>Analyses:</b>	Bioanalyzer, RT-qPCR
<b>Sample Type(s):</b>	Blood collected in PAXgene™ Blood RNA tubes stored at 4 or -20°C
<b>Input:</b>	Contents of a single tube.
<b>Materials Required:</b>	<ul style="list-style-type: none"><li>▪ PAXgene™ Blood RNA Tubes, BD Diagnostics 762165</li></ul>

This protocol was developed by Promega Applications Scientists and is intended for research use only.

Users are responsible for determining suitability of the protocol for their application.

Further information can be found in Technical Manual #TM442, available at: [www.promega.com/protocols](http://www.promega.com/protocols) or for further information, please contact [techserv@promega.com](mailto:techserv@promega.com)

#### Protocol:

Prior to RNA isolation, thaw blood at room temperature for 2 hours and invert at least 10 times.

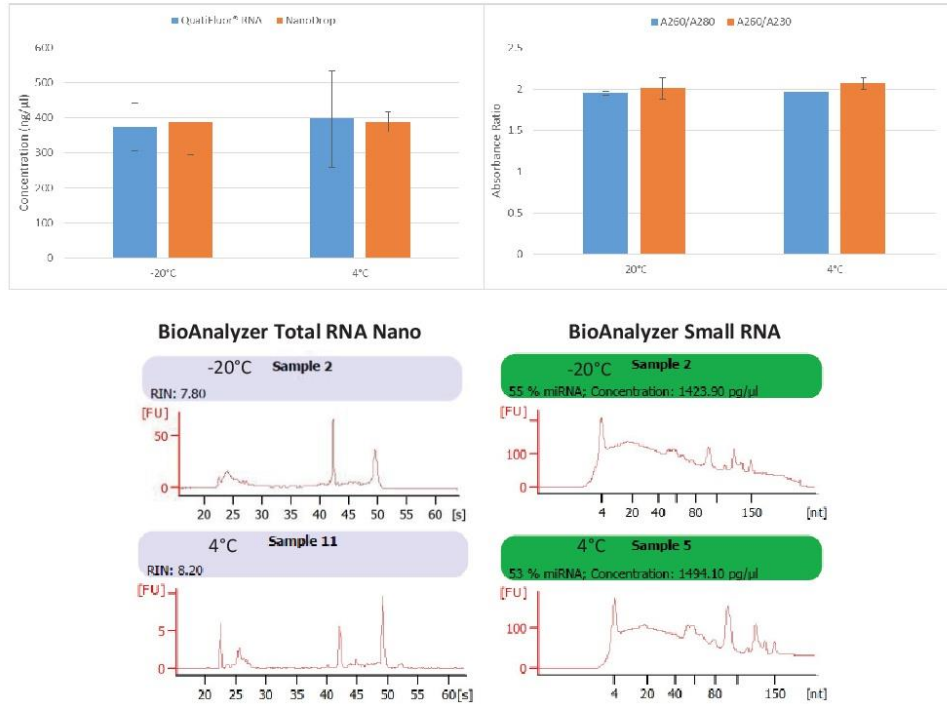
1. Centrifuge the PAXgene™ tubes at 3,000 x *g* for 10 minutes at room temperature to pellet the white blood cells.
2. Discard the supernatant and blot the top of the tube on a paper towel to remove excess solution.
3. Vortex the tube to re-suspend cells in remaining liquid.
4. Add 5ml nuclease-free water and vortex again to mix.
5. Centrifuge at 3,000 x *g* for 10 minutes at room temperature.
6. After centrifugation, discard the supernatant and blot the top of tube with paper towel to remove excess solution.
7. Vigorously vortex the cell pellet in the remaining liquid and place on ice.
8. Add 200µl of prepared Homogenization Buffer/ 1-Thioglycerol (at 20µl/ml) to re-suspend the WBC pellet. Vortex 15 seconds to re-suspend pellet.
9. Add 200µl of Lysis Buffer and 15µl Proteinase K.
10. Vortex for 20 seconds.
11. Incubate 10 minutes at room temperature.
12. Add entire volume to Well #1 of the Maxwell® RSC cartridge.
13. Add 10µl of DNase to Well #4.
14. Add a plunger to Well #8.
15. Add an elution tube and pipette 60µl of Nuclease-Free Water into each tube.
16. Run the microRNA protocol on the Maxwell® RSC





## Product Application

### Results:



**miRNA isolation from blood collected in PAXgene™ tubes on the Maxwell® RSC.** Blood was collected from a single individual into 6 PAXgene™ tubes then three were stored at 4°C and three frozen at -20°C. RNA was then isolated with the Maxwell® RSC miRNA Tissue Kit on a Maxwell® RSC. Total RNA concentration was measured by absorbance with a NanoDrop ONE instrument and by dye based quantitation using the Quantifluor® RNA System on a Quantus™ Fluorometer (Top left). Purity was measured by reading absorbance at 260nm, 230nm, and 280nm and calculating 260/230 and 260/280 ratios (Top right). RNA was analyzed on an Agilent 2100 BioAnalyzer using the total RNA Nano (RNA diluted 1:10) and Small RNA Kits (Bottom left and right, respectively).

## 7.3 Abbildungsverzeichnis

Abb. 1.1: ABCD-Klassifikation .....	7
Abb. 1.2: The Hallmarks of Aging.....	10
Abb. 3.1: Beispiele von Hautabdrücken des Innenarms .....	29
Abb. 3.1: Beispiele von Hautabdrücken des Augenaußenwinkels.....	30
Abb. 4.1: Korrelationen verschiedener Lungenfunktionsparameter in Form eines multiplen Streudiagramms.....	39
Abb. 4.2: Multiple Streudiagramme der Hautabdruckparameter des Augenaußenwinkels, welche die Korrelationen zwischen den verschiedenen Parametern schematisch verdeutlichen .....	44
Abb. 4.3: Multiple Streudiagramme der Hautabdruckparameter des Innenarms, welche die Korrelationen zwischen den verschiedenen Parametern schematisch verdeutlichen.....	45
Abb. 4.4: Streudiagramme ausgewählter Hautabdruckparameter des Innenarms und des Auges, welche die Korrelationen zwischen den Parametern schematisch verdeutliche .....	46
Abb. 4.5: Streudiagramme der Beziehungen zwischen drei repräsentativen Lungenfunktionsparametern und denjenigen Parametern des Auges, die in der Faktorenanalyse dem Faktor 1 zugeordnet waren.....	51
Abb. 4.6: Streudiagramme der Beziehungen zwischen drei repräsentativen Lungenfunktionsparametern und denjenigen Parametern des Auges, die in der Faktorenanalyse dem Faktor 2 zugeordnet waren .....	51
Abb. 4.7: Streudiagramme der Beziehungen zwischen drei repräsentativen Lungenfunktionsparametern und den Parametern des Innenarms, die in der Faktorenanalyse dem Faktor 1 zugeordnet waren ..	52
Abb. 4.8: Streudiagramme der Beziehungen zwischen drei repräsentativen Lungenfunktionsparametern und denjenigen Parametern des Innenarms, die in der Faktorenanalyse den Faktoren 2 und 3 zugeordnet waren.....	53
Abb. 4.9: Beziehung zwischen der Diffusionskapazität TLCO in Prozent vom Soll und dem Parameter Sp der Hautbeschaffenheit des Innenarms.....	54
Abb. 4.10: Beziehung zwischen der Diffusionskapazität TLCO in Prozent vom Soll und den für BMI, Alter, aktuellen Raucherstatus (ja/nein), Packyears und Geschlecht adjustierten Werten des Parameters sp der Hautbeschaffenheit des Innenarms .....	56
Abb. 4.11: Beziehung zwischen des Transferkoeffizienten KCO in Prozent vom Soll und den für BMI, Alter, aktuellen Raucherstatus (ja/nein), Packyears und Geschlecht adjustierten Werten des Parameters Sp der Hautbeschaffenheit des Innenarms .....	58
Abb. 4.12: Beziehungen zwischen Sauerstoffsättigung des Blutes und Partialdruck für Kohlendioxid sowie Sp und Smax als repräsentativen Parametern der Hautbeschaffenheit des Innenarms.....	60
Abb. 4.13: Histogramm der Verteilung des Parameters Ssk des Innenarms für die Gruppe der Patienten ohne die Diagnose einer Hyperlipidämie (links) oder mit der Diagnose einer Hyperlipidämie (rechts).....	64
Abb. 4.14: Beziehungen zwischen LL-37 und der Telomerenlänge von Blutleukozyten und den Parametern der Hautbeschaffenheit Sp und Ssk. Es zeigte sich kein klarer Zusammenhang .....	65

Abb. 4.15: Schema der signifikanten Beziehungen zwischen den Blutgasparametern sowie KCO %Soll und ausgewählten Genexpressionen molekularer Alterungsmarker, wenn die 5 anthropometrischen Kovariaten nicht berücksichtigt wurden. ....	74
Abb. 4.16: Beziehungen zwischen Sp als repräsentativem Parameter der Hautbeschaffenheit des Innenarms sowie der Anzahl der Falten als repräsentativen Parametern der Hautbeschaffenheit des Auges und der Genexpression der molekularen Alterungsmarker SOD2 und XRCC6 .....	76
Abb. 4.17: Beziehungen zwischen BMI und der Genexpression von zwei molekularen Markern .....	77
Abb. 4.18: Erweiterte Korrelationsgrafik: Beziehungen zwischen Alter, BMI sowie Packyears und der Genexpression von vier molekularen Markern .....	78
Abb. 4.19: Beziehungen zwischen ABI und der Genexpression von VEGFB.....	79
Abb. 4.20: Beziehungen zwischen der Leukozytenzahl sowie CRP und der Genexpression der molekularen Alterungsmarker SOD2, STAT3 und FOXO1 .....	80
Abb. 4.21: Beziehungen zwischen den über die drei Auswerter gemittelten periorbitalen und nasolabialen fotografischen Falten-Scores (horizontale Achse) sowie ausgewählten Parametern des Augenaußenwinkels (obere Teilbilder) und des Innenarms (untere Teilbilder), die mittels Replika-Technik bestimmt wurden .....	83

## 7.4 Tabellenverzeichnis

Tab. 4.1: Mittelwerte und Standardabweichungen der Basisparameter der Patienten.....	38
Tab. 4.2: Korrelationskoeffizienten der Lungenfunktionsparameter (n=46) gemäß Spearman sowie zugehörige zweiseitige Signifikanzniveaus .....	40
Tab. 4.3: Vergleich der Mittelwerte ausgewählter Lungenfunktionsparameter zwischen den beiden Gruppen, denen anhand einer berechneten Scorefunktion ein Emphysem zugeschrieben wurde oder nicht .....	41
Tab. 4.4: Statistische Kenngrößen der Parameter des Augenaußenwinkels, die aus den Hautabdrücken bestimmt werden konnten.....	43
Tab. 4.5: Statistische Kenngrößen der Parameter des Innenarms, die aus den Hautabdrücken bestimmt werden konnten .....	43
Tab. 4.6: Korrelationskoeffizienten der Hautparameter (n=44) gemäß Spearman sowie zugehörige zweiseitige Signifikanzniveaus .....	47
Tab. 4.7: Matrix mit den Ladungen der Parameter des Auges relativ zu den beiden in der Faktorenanalyse identifizierten Komponenten .....	48
Tab. 4.8: Matrix mit den Ladungen der Parameter des Innenarms relativ zu den drei in der Faktorenanalyse identifizierten Komponenten .....	49
Tab. 4.9: Regressionskoeffizienten (standardisiert und nicht standardisiert) für die Beziehung zwischen Sp (abhängige Variable) und die fünf angegebenen Prädiktoren in einer multiplen linearen Regressionsanalyse.....	56
Tab. 4.10: Regressionskoeffizienten (standardisiert und nicht standardisiert) für die Beziehung zwischen Sp (abhängige Variable) und die fünf angegebenen Prädiktoren in einer multiplen linearen Regressionsanalyse.....	57
Tab. 4.11: Korrelationen zwischen Sauerstoffsättigung des Blutes und Partialdruck für Kohlendioxid sowie Sp und Smax als repräsentativen Parametern der Hautbeschaffenheit des Innenarms .....	60
Tab. 4.12: Rotierte (Varimax) Ladungsmatrix einer Faktorenanalyse (Hauptkomponenten), in die alle Parameter des Innenarms sowie zusätzlich die Sauerstoffsättigung eingingen, um zu eruieren, mit welchem Faktor die Sauerstoffsättigung am ehesten zusammenhing.....	62
Tab. 4.13: Mittelwerte und Standardabweichungen der Genexpressionen .....	67
Tab. 4.14: Korrelationen der Genexpressionen untereinander in Kontrollgruppe und COPD-Gruppe zusammengefasst .....	69
Tab. 4.15: Korrelationen der Genexpressionen untereinander in der COPD-Gruppe allein genommen....	70
Tab. 4.16: Rotierte (Varimax) Ladungsmatrix einer Faktorenanalyse (Hauptkomponenten), in die alle Expressionen der Alterungsgene in der COPD-Gruppe eingingen.....	71
Tab. 4.17: Regressionskoeffizienten (nicht standardisiert und standardisiert) für die Beziehung zwischen der Genexpression von p21 (abhängige Variable) und den fünf angegebenen Prädiktoren in einer multiplen linearen Regressionsanalyse .....	73
Tab. 7.1: Beschreibung der Parameter der Hautabdrücke, übernommen aus Handbuch Primos (GFMSstechnik) .....	102



## 7.5 Literaturverzeichnis

- Agusti A et al. (2010). Characterisation of COPD heterogeneity in the ECLIPSE cohort. *Respir Res* 11:122.
- Aizen E and Gilhar A (2001). Smoking effect on skin wrinkling in the aged population. *Int J Dermatol* 40:431-433.
- Albrecht E et al. (2014). Telomere length in circulating leukocytes is associated with lung function and disease. *Eur Respir J* 43:983-992.
- Anderson D and Macnee W (2009). Targeted treatment in COPD: a multi-system approach for a multi-system disease. *Int J Chron Obstruct Pulmon Dis* 4:321-335.
- Ansellem V et al. (2011). Telomere dysfunction causes sustained inflammation in chronic obstructive pulmonary disease. *Am J Respir Crit Care Med* 184:1358-1366.
- Barnes PJ and Celli BR (2009). Systemic manifestations and comorbidities of COPD. *Eur Respir J* 33:1165-1185.
- Bickmore WA and van Steensel B (2013). Genome architecture: domain organization of interphase chromosomes. *Cell* 152:1270–1284.
- Brouillette SW et al. (2008). Telomere length is shorter in healthy offspring of subjects with coronary artery disease: support for the telomere hypothesis. *Heart* 94:422-425.
- Burgel PR, Paillasseur JL and Roche N (2014). Identification of clinical phenotypes using cluster analyses in COPD patients with multiple comorbidities. *Biomed Res Int* ID 420134.
- Burke B and Stewart CL (2013). The nuclear lamins: flexibility in function. *Nat Rev Mol Cell Biol* 14:13–24.
- Caputo R et al. (1990). The treatment of visible signs of senescence: The Italian experience. *Br J Dermatol* 122:97.
- Carruthers A et al. (2008). A validated grading scale for crow's feet. *Dermatol Surg* 34:173-178.
- Carruthers J et al. (2012). Validated assessment scales for the mid face. *Dermatol Surg* 38:320-332.
- Chan HL (1990). Cutaneous manifestations of cardiac diseases. *Singapore Med J* 31:480-485.
- Cerami C et al. (1997). Tobacco smoke is a source of toxic reactive glycation products. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94:13915-13920.
- Chilosi M et al. (2013). Premature lung aging and cellular senescence in the pathogenesis of idiopathic pulmonary fibrosis and COPD/emphysema. *Transl Res* 162:156–173.
- COSYCONET. German COPD and Systemic Consequences - Comorbidities Network. [zuletzt abgerufen 07.02.2019]; verfügbar unter: <http://www.asconet.net/html/cosyconet>.
- Criée CP et al. (2015). Leitlinie zur Spirometrie. *Pneumologie* 69:147-164.
- Criée CP et al. (2009). Empfehlungen zur Ganzkörperplethysmographie. Deutsche Atemwegsliga, Bad Lippspringe, und Dustri-Verlag Dr. Karl Feistle, München-Orlando.
- Crujeiras AB et al. (2008). Sirtuin gene expression in human mononuclear cells is modulated by caloric restriction. *Eur J Clin Inv* 38:672-678.

Dalton GD et al. (2017). New insights into the Mechanism of Action of Soluble Klotho. *Front Endocrinol (Lausanne)* 8:323.

Daniell HW (1971). Smoker's wrinkles. A study in the epidemiology of "crow's feet". *Ann Intern Med* 75:873-880.

Dechat T et al. (2010). Nuclear lamins. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 2:a000547

De Ritis S (2010). Wirkung von Zigarettenrauchextrakt auf die Proliferation menschlicher Lungenfibroblasten – Beitrag von Nikotin und Oxidantien. Dissertation, LMU München, Medizinische Fakultät.

Deslee G et al. (2010). Cigarette Smoke Induces Nucleic-Acid Oxidation in Lung Fibroblasts. *Am J Respir Cell Mol Biol* 43:576-584.

Edwards C, Heggie R and Marks R (2003). A study of differences in surface roughness between sun-exposed and unexposed skin with age. *Photodermatol, Photoimmunolog Photomed* 19:169-174.

Epel ES et al. (2004). Accelerated telomere shortening in response to life stress. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101:17312-17315.

Fell VL and Schild-Poulter C (2012). Ku Regulates Signaling to DNA Damage Response Pathways through the Ku 70 von Willebrand A Domain. *Mol Cell Biol* 32:76-87.

Flynn TC et al. (2012). Validated assessment scales for the upper face. *Dermatol Surg* 38:309-319.

Frances C et al. (1998). Smoker's Wrinkles: Epidemiological and Pathogenic Considerations. *Clin Dermatol* 16:565-570.

Gan WQ et al. (2004). Association between chronic obstructive pulmonary disease and systemic inflammation: a systematic review and a meta-analysis. *Thorax* 59:574-580.

GF Messtechnik GmbH, Handbuch Optisches 3D-Hautmessgerät PRIMOS<sup>te</sup>, Software PRIMOS 5.7.

Gkogkolou P and Böhm M (2012). Advanced glycation end products: Key players in skin aging? *Dermatoendocrinol* 4:259-270.

GOLD. Global Initiative for Chronic Obstructive Lung Disease. [zuletzt abgerufen 03.03.2019]; verfügbar unter: <http://www.goldcopd.com/>.

Gonzalo S et al. (2017). Hutchinson-Gilford Progeria Syndrome: A premature aging disease caused by LMNA gene mutations. *Ageing Res Rev* 33:18-29.

Hashimoto K (2007). New methods for surface ultrastructure: Comparative studies of scanning electron microscopy, transmission electron microscopy and replica method. *Int J Dermatol* 13:874-887.

Heyne C (2011). Wirkung von Zigarettenrauch, Nikotin und N-Acetylcystein auf die Differenzierung und Funktion von Präadipozyten. Dissertation, LMU München, Medizinische Fakultät.

Hillas G et al. (2015). Managing comorbidities in COPD. *Int J Chron Obstruct Pulmon Dis* 10:95–109.

Holz O et al. (2004). Lung fibroblasts from patients with emphysema show a reduced proliferation rate in culture. *Eur Respir J* 24:575-579.

Houben-Wilke S et al. (2017). Peripheral Artery Disease and its Clinical Relevance in Patients with COPD in the COSYCONET Study. *Am J Resp Crit Care Med* 195:189-197.

Huang H and Manton KG (2004). The role of oxidative damage in mitochondria during aging: a review. *Front Biosci* 9:1100–1117.

- Huber M et al. (2015). Comorbid influences on generic health-related quality of life in COPD: a systematic review. *PLoS One* 10(7):e0132670.
- Izzotti A et al. (2004). Alterations of gene expression in skin and lung of mice exposed to light and cigarette smoke. *FASEB J* 18:1559-15561.
- Jörres RA et al. (2010). [Systemic manifestations and comorbidities in patients with chronic obstructive pulmonary disease (COPD) and their effect on clinical state and course of the disease - an overview of the cohort study COSYCONET] *Dtsch Med Wochenschr* 135:446-449.
- Jörres RA (2006). Die chronisch-obstruktive Lungenerkrankung und das Lungenemphysem: Klinische, funktionelle, zelluläre und molekulare Befunde unter der Hypothese der induzierten Seneszenz. Habilitation, LMU München, Medizinische Fakultät.
- Ju Z, Choudhuri AR and Rudolph KL (2007). A Dual Role of p21 in Stem Cell Aging. *Ann N Y Acad Sci* 1100:333-344.
- Kahnert K et al. (2018). Relationship of spirometric, body plethysmographic, and diffusing capacity parameters to emphysema scores derived from CT scans. *Chron Respir Dis* 18:1479972318775423.
- Karch A et al. (2016). The German COPD cohort COSYCONET: Aims, methods and descriptive analysis of the study population at baseline. *Respir Med* 14:27-37.
- Karrasch S, Holz O and Jörres RA (2008). Aging and induced senescence as factors in the pathogenesis of lung emphysema. *Respir Med* 102:1215-1230.
- Karrasch S et al. (2018). Heterogeneous pattern of differences in respiratory parameters between elderly with either good or poor FEV1. *BMC Pulm Med* 18:27.
- Kennedy C et al. (2003). Effect of smoking and sun on the aging skin. *J Invest Dermatol* 120:548-554.
- Kilic U et al. (2015). A remarkable Age-Related Increase in SIRT1 Protein Expression against Oxidative Stress in Elderly: SIRT1 Gene Variants and Longevity in Human *PLoS One* 10:e0117954.
- Klinkhammer BM et al. (2014). Mesenchymal stem cells from rats with chronic kidney disease exhibit premature senescence and loss of regenerative potential. *PLoS One* 9:e92115.
- Lange P and Schnohr P (1994). The relationship between facial wrinkling and airflow obstruction. *Int J Dermatol* 33:123-126.
- Lahmann C et al. (2001). Matrix metalloproteinase-1 and skin ageing in smokers. *Lancet* 357:935-936.
- Lee SH et al. (2019). Sirtuin signaling in cellular senescence and aging. *BMB Rep* 52:24–34.
- Leung WC and Harvey I (2002). Epidemiology and Health Services Research: Is Skin ageing the elderly caused by sun exposure or smoking? *Br J Dermatol* 147:1187-1191.
- Lohwasser C et al. (2006). The receptor for advanced glycation end products is highly expressed in the skin and upregulated by advanced glycation end products and tumor necrosis factor-alpha. *J Invest Dermatol* 126:291-299.
- Lopez AD et al. (2006). Chronic obstructive pulmonary disease: current burden and future projections. *Eur Respir J* 27:397-412.
- Lopez-Otin C et al. (2013). The Hallmark of Aging. *Cell* 153:1194-1217.
- Lucke T (2015). Vergleichende Analyse biologischer Alterungsmarker bei Patienten mit chronisch-obstruktiver Lungenerkrankung (COPD). Dissertation, LMU München, Medizinische Fakultät.
- Lucke T et al. (2016). Systematic Analysis of Self-Reported Comorbidities in Large Cohort Studies – A Novel Stepwise Approach by Evaluation of Medication. *PLoS One* 11:e0163408.

- Machata B (2010). Wirkung von Zigarettenrauch auf Präadipozyten als potentielle systemische Modifikatoren einer COPD. Dissertation, LMU München, Medizinische Fakultät.
- Maclay J. et al. (2012). Systemic elastin degradation in chronic obstructive pulmonary disease. *Thorax* 67:606-612.
- Macintyre N et al. (2005). Standardisation of the single-breath determination of carbon monoxide uptake in the lung. *Eur Respir J* 26:720-735.
- Masaki H, Okano Y and Sakurai H (1997). Generation of Active Oxygen Species from Advanced Glycation End-Products (AGE) under Ultraviolet Light A (UVA) Irradiation. *Biochem Biophys Res Comm* 235:306-310.
- Matsuyama S et al. (2016). Bax-induced apoptosis shortens the life span of DNA repair defect Ku70-knockout mice by inducing emphysema. *Exp Biol Med* 241:1265-1271.
- Maynard S et al. (2019). Lamin A/C promotes DNA base excision repair. *Nucleic Acids Res* 47: 11709–11728.
- McAllister DA et al. (2007). Arterial Stiffness Is Independently Associated with Emphysema Severity in Patients with Chronic Obstructive Pulmonary Disease. *Am J Respir Crit Care Med* 176:1208-1214.
- Mendez-Bermudez A et al. (2018). Genome-wide Control of Heterochromatin Replication by the Telomere Capping Protein TRF2. *Mol Cell* 70:449-461.
- Miller MR et al. (2005). Standardisation of spirometry. *Eur Respir J* 26:319-338.
- Morita A (2007). Tobacco smoke causes premature skin aging. *J Dermatol Sci* 48:169-175.
- Morlá M et al. (2006). Telomere shortening in smokers with and without COPD. *Eur Respir J* 27:525-528.
- Morris BJ et al. (2015). FOXO3: A Major Gene for Human Longevity - A Mini-Review. *Gerontology* 61:515-525.
- Müller KC et al. (2006). Lung fibroblasts from patients with emphysema show markers of senescence in vitro. *Respir Res* 7:32.
- Murray CJL and Lopez AD (1997). Alternative projections of mortality and disability by cause 1990–2020: Global Burden of Disease Study. *The Lancet* 349:1498-1504.
- Nandi A et al. (2019). Role of Catalase in Oxidative Stress- and Age-Associated Degenerative Diseases. *Oxid Med Cell Longev* 2019:9613090
- Narins RS et al. (2012). Validated assessment scales for the lower face. *Dermatol Surg* 38:333-342.
- North BJ and Sinclair DA (2012). The Intersection Between Aging and Cardiovascular Disease. *Circ Res* 110:1097-1108.
- Nyunoya T et al. (2006). Cigarette smoke induces cellular senescence. *Am J Respir Cell Mol Biol* 35:681-688.
- Nyunoya T et al. (2009). Cigarette Smoke Induces Cellular Senescence via Werner's Syndrome Protein Down-regulation. *Am J Respir Cell Mol Biol* 179:279-287.
- Okano Y, Masaki H and Sakurai H (2002). Dysfunction of dermal fibroblasts induced by advanced glycation end-products (AGES) and the contribution of a nonspecific interaction with cell membrane and AGES. *J Dermat Sci*, 2002. 29:171-180.

Patel BD et al. (2006). Smoking related COPD and facial wrinkling: is there a common susceptibility? *Thorax* 61:568-571.

Pichierri P et al. (2011). The Werner syndrome protein: linking the replication checkpoint response to genome stability. *Aging* 3:311-318.

Pirisinu M and Mazzarello V (2015). 3D profilometric characterization of the aged skin surface using a skin replica and alicona Mex software. *38:213-220*.

Quan MB, Edwards C and Marks R (1997). Non-invasive in vivo techniques to differentiate photodamage and ageing in human skin. *Acta Derm Venereol* 77:416-419.

Quanjer PH et al. (2012). Multi-ethnic reference values for spirometry for the 3–95 yr age range: the global lung function 2012 equations. *Eur Respir* 40:1324-1343.

Rabe KF et al. (2007). Global Strategy for the Diagnosis, Management, and Prevention of Chronic Obstructive Pulmonary Disease. *Am J Respir Crit Care Med* 176:532-555.

Rajendrasozhan S et al. (2008). SIRT1, an Antiinflammatory and Antiaging Protein, Is Decreased in Lungs of Patients with Chronic Obstructive Pulmonary Disease. *Am J Respir Crit Care Med* 177:861-870.

Rashid K et al. (2018). Lung cellular senescence is independent of aging in a mouse model of COPD/emphysema. *Sci Rep* 8:9023.

Rassow et al. Hrsg. (2012). *Biochemie*. Thieme Stuttgart 3. Auflage.

Regulski MJ (2017). Cellular Senescence: What, Why, and How. *Wounds* 29:168–174.

Renzoni E et al. (2014). Pathogenesis of idiopathic pulmonary fibrosis: review of recent findings, *F1000Prime Rep* 6:69.

Rubino C et al. (2005). A prospective Study of Anti-Aging Topical Therapies Using a Quantitative Method of Assesment. *Plast Reconstr Surg* 115:1156-1162.

Rutten EPA et al. (2016). Various Mechanistic Pathways Representing the Aging Process Are Altered in COPD. *Chest* 149:53-61.

Rzany B et al. (2012). Validated composite assessment scales for the global face. *Dermatol Surg* 38:294-308.

Sandberg LB, Soskel NT and Leslie JG (1981). Elastin Structure, Biosynthesis, and Relation to Disease States. *NEJM* 304:566-579.

Savale L et al. (2009). Shortened telomeres in circulating leukocytes of patients with chronic obstructive pulmonary. *Am J Respir Crit Care Med* 179:566-571.

Schindler S (2015). Wirkung von Zigarettenrauchextrakt und Wasserstoffperoxid auf das Wachstumsverhalten menschlicher Lungenfibroblasten. Dissertation, LMU München, Medizinische Fakultät.

Schneider KM, O'Donnell BE and Dean D (2009). Prevalence of multiple chronic conditions in the United States' Medicare population. *Health Qual Life Outcomes* 2009. 7:82.

Si X et al. (2018). Loss of p21 promoted tumorigenesis in the background of telomere dysfunctions induced by TRF2 and Wtn deficiency. *Int J Biol Sci* 14:165–177.

Sommers JA et al. (2019). A high-throughput screen to identify novel small molecule inhibitors of the

Werner Syndrome Helicase-Nuclease (WRN). PLoS One 14:e0210525.

Spurzem JR and Rennard SI (2005). Pathogenesis of COPD. Semin Respir Crit Care Med 26:142-153.

Stanojevic S et al. (2017). Official ERS technical standards: Global Lung Function Initiative reference values for the carbon monoxide transfer factor for Caucasians. Eur Respir J 50:1700010.

Stavem K et al. (2005). Lung function, smoking and mortality in a 26-year follow-up of healthy middle-aged males. Eur Respir J 25:618-625.

Suzuki M et al. (2008). Decreased airway expression of vascular endothelial growth factor in cigarette smoke-induced emphysema in mice and COPD patients. Inhal Toxicol 20:349-359.

Tabara Y et al. (2014). Airflow limitation in smokers is associated with arterial stiffness: The Nagahama Study. Atherosclerosis 232:59-64.

Tian et al. (2018). Role of Forkhead Box O (FOXO) transcription factor in aging and diseases. Gene 648:97-105.

Trojan C (2016). Struktur- und Funktionsparameter zur Quantifizierung der Hautalterung. Dissertation, Charité Universitätsmedizin Berlin, Medizinische Fakultät.

Trudzinski FC et al. (2019). Consequences of chronic kidney disease in chronic obstructive pulmonary disease. Respir Res 20:151.

Tsuji T, Aoshima K and Nagai A (2006). Alveolar cell senescence in patients with pulmonary emphysema. Am J Respir Crit Care Med 174:886-893.

Valipour A et al. (2008). Circulating vascular endothelial growth factor and systemic inflammatory markers in patients with stable and exacerbated chronic obstructive pulmonary disease. Clin Sci 115:225-232.

Vanfleteren LEGW et al. (2013). Clusters of Comorbidities Based on Validated Objective Measurements and Systemic Inflammation in Patients with Chronic Obstructive Pulmonary Disease. Am J Respir Crit Care Med. 187:728-735.

Vestbo J et al (2013). Global Strategy for the Diagnosis, Management, and Prevention of Chronic Obstructive Pulmonary Disease. Am J Respir Crit Care Med. 187:347-365.

Vetrano D et al. (2016). Chronic diseases and geriatric syndromes: the different weight of comorbidities. Eur J Intern Med 27:62-67.

Voelkel NF et al. (2011). COPD/Emphysema: The vascular story. Pulm Circ 1:320-326.

Vogelmeier CF et al. (2017). Global Strategy for the Diagnosis, Management, and Prevention of Chronic Obstructive Lung Disease 2017 Report: GOLD Executive Summary. Arch Bronchopneumol 53:128-149.

Wanger J et al. (2005). Standardisation of the measurement of lung volumes. Eur Respir J 26:511-522.

Watz H et al. (2009). The metabolic syndrome in patients with chronic bronchitis and COPD: frequency and associated consequences for systemic inflammation and physical inactivity. Chest 136:1039-1046.

Weischer M, Bojesen SE and Nordestgaard BG (2014). Telomere Shortening Unrelated to Smoking, Body Weight, Physical Activity, and Alcohol Intake: 4,576 General Population Individuals with Repeat Measurements 10 Years Apart. PLoS Genet 10:e1004191.

Weismann N (2018). Chronic Obstructive Pulmonary Disease and Pulmonary Vascular Disease. A Comorbidity? *Ann Am Thorac Soc* 15:278-281.

Yanagisawa S et al. (2017). Decreased Serum Sirtuin-1 in COPD. *Chest* 152:343–352.

Yin L et al. (2001<sub>a</sub>). Skin premature aging induced by tobacco smoking: the objective evidence of skin replica analysis. *J Dermatol Sci* 27:26-32.

Yin L et al. (2001<sub>b</sub>). Skin aging induced by ultraviolet exposure and tobacco smoking: evidence from epidemiological and molecular studies. *Photodermatol Photoimmunol Photomed* 17:178-183.

Links zu Informationen über einige der untersuchten Gene:

STAT3: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/6774>

TERF2: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/7014>

VEGFB: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/7423>

## 8 Danksagung

Meinem Doktorvater, Herrn PD Dr. rer. nat. Rudolf A. Jörres, danke ich dafür, das Thema dieser Dissertation zur Verfügung gestellt zu haben, sowie für seine hervorragende Betreuung und die fachliche Unterstützung.

Für die wissenschaftliche Unterstützung bedanke ich mich ferner bei den Mitarbeitern bzw. ehemaligen Mitarbeitern des Instituts und Poliklinik für Arbeits-, Sozial- und Umweltmedizin der LMU München, insbesondere bei Herrn Dr. S. Karrasch für die Einarbeitung bei der Herstellung und Auswertung der Hautabdrücke sowie bei der Aufnahme der Photographien, bei Frau Dr. T. Lucke für die Mithilfe bei der Auswertung der Hautfalten auf Basis von Fotos sowie ihren fachlichen Rat, des Weiteren bei Frau PD Dr. K. Kahnert für ihren Rat bei der Erstellung der Arbeit.

Frau CTA A. Kronseder danke ich ganz besonders für die Einarbeitung in die molekularbiologischen Labortechniken, die Etablierung der RNA-Isolierung und qPCR sowie die Mithilfe bei der Auswertung der Hautfalten anhand von Fotoaufnahmen.

Frau MTA J. Schäfer danke ich für die Einarbeitung als Study Nurse in das Untersuchungsprogramm von COSYCONET. Mein Dank gilt des Weiteren den Ärzten der Ambulanz des Instituts und der Poliklinik für Arbeits-, Sozial- und Umweltmedizin des Klinikums der LMU München, die mich unterstützt haben.

Herrn G. Müller danke ich für die Einarbeitung bei der Messung der Hautreplika sowie bei der Auswertung.

Für die gute Zusammenarbeit danke ich der Studienzentrale in Marburg, insbesondere Frau Dr. S. Söhler, sowie den COSYCONET-Mitarbeitern an der MHH Hannover, vor allem Frau N. Adaskina und Herrn F. Biertz.

Nicht zuletzt bedanke ich mich bei allen Probanden, die an der Studie teilgenommen haben, das aufwendige Untersuchungsprogramm mitmachten und somit diese Arbeit ermöglicht haben.



